

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

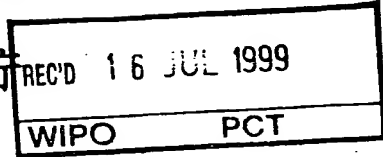
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP99/03054

07.06.99 S

JP99/03054
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 1998年6月8日
Date of Application:

出願番号 PCT/JP98/2542号
Application Number:

出願人 扶桑薬品工業株式会社
Applicant (s): 山元 弘
辻川和丈
内野由紀子

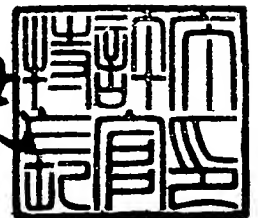
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 建 志



出証平 11-500034

PCT/JP98/02542

国際出願書

(受付印)

08.06.98

PCT International Application
日本国特許庁出願人又は代理人の書面記号
(希望する場合は最大12字)

98P066WO

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

第I欄 発明の名称

LARのチロシンホスファターゼサブユニットに対する抗体

第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

扶桑薬品工業株式会社

FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
7-10, Dosho-machi 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
Osaka 541-0045 JAPAN☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

06-969-3131

ファクシミリ番号:

06-969-0918

加入電信番号:

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☒ 米国を除くすべての指定国

住所(国名):

日本国 JAPAN

☐ 米国のみ☐ 追加欄に記載した指定国第III欄 その他の出願人又は発明者
氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

山元 弘 YAMAMOTO Hiroshi

〒560-0054 日本国大阪府豊中市桜の町7丁目11-1-103
11-1-103, Sakurancho 7-chome, Toyonaka-shi, Osaka 560-0054 JAPANこの欄に記載した者は
次に該当する:☐ 出願人である。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者である。
(ここにレ印を付したとき
は以下に記入しないこと)

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国

住所(国名):

日本国 JAPAN

☒ 米国のみ☐ 追加欄に記載した指定国第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名
記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

☒ 代理人☐ 共通の代表者586 弁理士 角田 嘉宏 SUMIDA Yoshihiro
896 弁理士 高石 郷 TAKAISHI Satoru
3624 弁理士 古川 安郷 FURUKAWA Yasuyuki
1794 弁理士 岡 憲英 OKA Kengo
816 弁理士 阪本 英男 SAKAMOTO Hideo
095 弁理士 西谷 俊男 NISHITANI Toshio

電話番号:

078-321-8822

ファクシミリ番号:

078-391-5791

加入電信番号:

〒650-0031 日本国兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階
F1 Boeki Bldg. 123-1, Higashimachi, Chuo-ku,
e-shi, Hyogo 650-0031 JAPAN又は共通の代表者が選任されていないときに、通知が送付されるあて名を記載する場合はレ印を付す
RO 101 (第1用紙) (1994年7月5日、再版1996年1月)

(名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

辻川 和文 TSUJIKAWA Kazutake

〒666-0145 日本国兵庫県川西市けやき坂3丁目11-7
11-7, Keyakizaka 3-chome, Kawanishi-shi, Hyogo 666-0145 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここにし印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

内野 由紀子 UCHINO Yukiko

〒562-0031 日本国大阪府箕面市小野原東1丁目1-60-307
1-60-307, Onoharahigashi 1-chome, Minoh-shi, Osaka 666-0145 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここにし印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここにし印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここにし印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が税関に記載されている。

9(a)の規定に基づき次の国を指定する(該当する□内にレ印を付すこと、及び少なくとも1国を指定すること)。

☐ **AP** **ARIPO** 特許: **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan,
SZ スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国

☐ **E A** ユーラシア特許： **A Z** アゼルバイジャン Azerbaijan. **BY** ベラルーシ Belarus. **KZ** カザフスタン Kazakstan.
RU ロシア連邦 Russian Federation. **TJ** タジキスタン Tajikistan. **TM** トルクメニスタン Turkmenistan. 及びユーラシア特
許条約と特許協力条約の締約国である他の国

V **EP** ヨーロッパ特許：AT オーストリア Austria. BE ベルギー Belgium. CH and LI スイス及びリヒテン
 シュテン Switzerland and Liechtenstein. DE ドイツ Germany. DK デンマーク Denmark. ES スペイン Spain.
FR フランス France. GB 英国 United Kingdom. GR ギリシャ Greece. IE アイルランド Ireland.
IT イタリア Italy. LU ルクセンブルグ Luxembourg. MC モナコ Monaco. NL オランダ Netherlands.
PT ポルトガル Portugal. SE スウェーデン Sweden. 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国

☐ **OA** **OAPI** 特許：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso. BJ ベナン Benin. CF 中央アフリカ Central African Republic. CG コンゴ Congo. CI 象牙海岸 Côte d'Ivoire. CM カメルーン Cameroun. GA ガボン Gabon. GN ギニア Guinea. ML マリ Mali. MR モーリタニア Mauritania. NE ニジェール Niger. SN セネガル Senegal. TD チャド Chad. TG トーゴ Togo. 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
 他の国（他のOAPI保護を求める場合には点線の上に記す）

国内特許（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線上に記載する）

- | | | |
|-------------------------------------|-----------|--|
| <input type="checkbox"/> | AL | アルバニア Albania |
| <input type="checkbox"/> | AM | アルメニア Armenia |
| <input type="checkbox"/> | AT | オーストリア Austria |
| <input checked="" type="checkbox"/> | AU | オーストラリア Australia |
| <input type="checkbox"/> | AZ | アゼルバイジャン Azerbaijan |
| <input type="checkbox"/> | BB | バルバドス Barbados |
| <input type="checkbox"/> | BG | ブルガリア Bulgaria |
| <input type="checkbox"/> | BR | ブラジル Brazil |
| <input type="checkbox"/> | BY | ベラルーシ Belarus |
| <input checked="" type="checkbox"/> | CA | カナダ Canada |
| <input type="checkbox"/> | CH | and L I スイス及びリヒテンシュタイン
Switzerland and Liechtenstein |
| <input type="checkbox"/> | CN | 中国 China |
| <input type="checkbox"/> | CZ | チェッコ Czech Republic |
| <input type="checkbox"/> | DE | ドイツ Germany |
| <input type="checkbox"/> | DK | デンマーク Denmark |
| <input type="checkbox"/> | EE | エストニア Estonia |
| <input type="checkbox"/> | ES | スペイン Spain |
| <input type="checkbox"/> | FI | フィンランド Finland |
| <input type="checkbox"/> | GB | 英国 United Kingdom |
| <input type="checkbox"/> | GE | グルジア Georgia |
| <input type="checkbox"/> | HU | ハンガリー Hungary |
| <input type="checkbox"/> | IS | アイスランド Iceland |
| <input checked="" type="checkbox"/> | JP | 日本 Japan |
| <input type="checkbox"/> | KE | ケニア Kenya |
| <input type="checkbox"/> | KG | キルギスタン Kyrgyzstan |
| <input checked="" type="checkbox"/> | KR | 韓国 Republic of Korea |
| <input type="checkbox"/> | KZ | カザフスタン Kazakstan |
| <input type="checkbox"/> | LK | スリ・ランカ Sri Lanka |
| <input type="checkbox"/> | LR | リベリア Liberia |
| <input type="checkbox"/> | LS | レソト Lesotho |
| <input type="checkbox"/> | LT | リトアニア Lithuania |
| <input type="checkbox"/> | LU | ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> | LV | ラトヴィア Latvia |
| <input type="checkbox"/> | MD | モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> | MG | マダガスカル Madagascar |
| <input type="checkbox"/> | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア The former Yugoslav Republic
of Macedonia |

- | | | |
|-------------------------------------|-----------|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> | MN | モンゴル Mongolia |
| <input type="checkbox"/> | MW | マラウイ Malawi |
| <input type="checkbox"/> | MX | メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> | NO | ノルウェー Norway |
| <input type="checkbox"/> | NZ | ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input type="checkbox"/> | PL | ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> | PT | ポルトガル Portugal |
| <input type="checkbox"/> | RO | ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> | RU | ロシア連邦 Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> | SD | スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> | SE | スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> | SG | シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> | SI | スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> | SK | スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> | TJ | タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> | TM | トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> | TR | トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> | TT | トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> | UA | ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> | UG | ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> | US | 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> | UZ | ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> | VN | ヴェトナム Viet Nam |

下の欄は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- [illegible]

[illegible]

第VI欄 優先権主張

他の優先権の主張が追記欄に記載される

☐

先の出願に基づく優先権を主張する

国名 (その国において又はその 国について出願された)	先の出願の日 (日. 月. 年)	先の出願の番号	先の出願がされた官庁名 (広域出願又は国際出願のみ)
(1)			
(2)			
(3)			

先の出願が、本件国際出願について受理官庁である国内官庁に対して行われたときは、出願人は、手数料の納付を条件に以下を請求する。

☐ 上記の先の出願のうち次の番号の出願書類の認証書を作成し国際事務局へ送付することを特許庁長官に請求している。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

ISA / JP

先の調査 国際調査機関による調査 (国際・国際型又はその他) を既に請求しており、可能な限り当該調査の結果を国際調査の基礎とすることを請求する場合に記入する。関連する出願 (若しくはその続記) 又は関連する調査請求を表示することにより当該調査又は請求を特定する:

国名 (又は広域官庁)

出願日 (日. 月. 年)

番号

第VIII欄 照合欄

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

1. 願書	4 枚
2. 明細書	50 枚
3. 請求の範囲	2 枚
4. 要約書	1 枚
5. 図面	9 枚
合計	66 枚

出願時におけるこの国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- | | |
|---|--|
| 1. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 5. <input checked="" type="checkbox"/> 所定の手数料の納付 |
| 2. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し | <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 |
| 3. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) の説明書 | <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 |
| 4. <input type="checkbox"/> 上記第VI欄に記載された優先権書類 (具体的に記載する): | 6. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物に関する書面 |
| | 7. <input checked="" type="checkbox"/> ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リスト (フレキシブルディスク) |
| | 8. <input checked="" type="checkbox"/> その他 (具体的に記載する) |
- 「陳述書、フレイミング」記録形式等の情報を記載した書面」

要約書とともに公表する図として 第 _____ 図 を提示する (図面がある場合)

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名を記載し、その次に押印する。願書により資格が明白に表示されていない場合はその者が押印している資格を表示する。

角 田 嘉 宏



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日 08.06.98	2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある
3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日	
5. 出願人により特定された 国際調査機関 ISA /	
6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

P C T

手数料計算用紙

願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

98P066WO

受理官庁の日付印

出願人

扶桑薬品工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 2. 法第18条第1項第1号の規定による手数料

95,000 円 T+S

3. 国際手数料

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 66 枚

最初の30枚まで

55,000 円 b1

$\frac{36}{30}$ 枚を超える用紙の枚数 $\times \frac{1,300}{\text{用紙1枚の手数料}}$ =

46,800 円 b2

b1及びb2に記入した金額を加算し合計額をBに記入

101,800 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定国数 6 ヶ国

$\frac{6}{\text{指定手数料の支払計算に必要となる基礎数値(最高11)}}$ $\times \frac{12,700}{\text{指定手数料}}$ =

76,200 円 D

B及びDに記入した金額を加算し合計額をIに記入

178,000 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

273,000 円

合 計

(注意1) 法第18条第1項第1号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

(注意2) 国際手数料については、特許庁長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

55,000

55,000

46,800

101,800

76,200

178,000

273,000

PT/PPS/00000

預金払戻請求書・預金口座振替による 振込受付書(兼手数料受取書)
振込金受取書(兼手数料受取書)

未収	特記	一括 契約	後取り明記	領収済	消費税込手数料
				境ノ振	

ご依頼日 年 月 日

(注) 消費税が含まれています。

お振込先銀行 支店	口座番号	お受取人	金額	振込手数料
1 東京三菱 (店番)	1. 番 2. 当 3. 野 4. 野 5. 野	フリガナ WIPG-PCJ GENEV様	100	100
2 東京三菱 (店番)	1. 番 2. 当 3. 野 4. 野 5. 野	フリガナ 様	100	100
お受取人でんわ (市外局番) 局 番			合計	円
ご依頼人 フリガナ 有古特許事務所様			小切手等	円
おとところ ご連絡先でんわ(市外局番) 局 番				円
神戸市中央区東町123番地の1貿易ビル3階				円

- 振込先銀行へは、受取人名のほか預金種目・口座番号を通知します。受取人名等はカナ文字により送信します。
- 振込依頼書に記載相違等の不備があった場合には、照会等のために振込が遅延したり、振込ができないことがあります。
- 通信機器、回線の障害または郵便物の遅延等やむを得ない事由によって、振込が遅延することがありますのでご了承ください。
- ご指定の口座から預金を払戻して振込む場合、その払戻しができないときは振込ができませんのでご注意ください。

- この振込受付書は、振込ができない場合などに廃棄となりますので、ご依頼人が大切に保管してください。
- 上記の小切手等が不渡りとなったとき、その金額の振込を取消し、小切手等は権利発生し手続を完了しないで、当店において返却します。

ご利用くださいまして
ありがとうございました。

出納

10. 6. 5

東京三菱(4) 西村



株式会社 東京三菱銀行

支店

33230 33 86 96 11 971

基本手数料 101,800円
指定手数料 76,200円
合 計 178,000円

08.06.98

陳 述 書

特許庁長官 荒井 寿光 殿

本書に添付したフレキシブルディスクに記載した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものではないことを陳述します。

平成10年6月5日

PCT/JP98/02542

国際出願の表示：平成10(1998)年6月5日提出の国際出願

書類記号：98P066WO

発明の名称： LARのチロシンホスファターゼサブユニットに対する抗体

出願人代理人： 弁理士 角 田 嘉 宏



フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

1. 出願人名称：扶桑薬品工業株式会社

2. 代理人氏名：弁理士 角田嘉宏

PCIN768/02542

3. 国際出願の表示：平成10(1998)年6月5日提出の国際出願

書類記号：98P066WO

4. 発明の名称：LARのチロシンホスファターゼサブユニットに対する抗体

5. 使用した文字コード：シフトJISコード

6. 配列を記録したファイル名：98066SEQ. txt

7. 連絡先：有古特許事務所

・電話番号 (078) 321-8822

・担当者氏名 石田 広子

LARのチロシンホスファターゼサブユニットに対する抗体

5 〔技術分野〕

本発明は、インスリンレセプターチロシンキナーゼを不活性化するLAR（白血球共通抗原類似分子）においてホスファターゼ活性を担うP-サブユニット（ホスファターゼサブユニット）に対して特異性を有する抗体、特にLARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体に関し、さらに詳細には、プロテインチロシンホスファターゼの解析および定量、LAR関連分子の同定および取得、ならびにインスリン抵抗性に関わる症状の治療、予防、緩和等のための処置や診断に適用可能な医薬の開発などに有用な抗体に関する。

1 5 〔背景技術〕

近年、動脈硬化発症メカニズムが徐々に明らかにされ、その危険因子が同定されつつある。特に高コレステロール血症、高血圧症、糖尿病および喫煙が動脈硬化の4大危険因子と認定され、その治療が積極的に行われている。これらの病態として臨床的に共通しているのが、インスリン抵抗性である。インスリン抵抗性とは細胞におけるインスリン感受性の低下とほぼ同義語であり、細胞での糖の取り込みにおけるインスリン作用が低下していることを指す。その原因としてはインスリン分泌自体の異常、標的細胞におけるインスリン受容体の異常、細胞内情報伝達系の異常および血行力学的に末梢循環障害に基づく糖の組織への供給減等がある。Reavenは1988年、このインスリン抵抗性を基盤として多くの病態が引き起こされることを報告し、また、インスリン抵抗性、耐糖能異

常、高インスリン血症、高トリグリセライド血症、低 HDL コレステロール血症、高血圧をマルチプルに持つ病態をシンドローム X と名付け、動脈硬化発症に深く関わっていることを提唱した (Reaven, G. M. *et al.* ; *Diabetes*, 37, 1595-1607, 1988)。

- 5 また、一般的に、インスリン抵抗性により細胞への糖の供給は低下し、
 膵臓におけるインスリン分泌を亢進させ、高インスリン血症を引き起こ
 すことが知られており、臨床の場合においてもインスリン抵抗性の問題が
 種々浮上している。例えば、インスリン抵抗性・高インスリン血症が糖
 尿病性腎症を促進し (Niskanen, L. *et al.* ; *Diabetes*, 41, 736-741,
 1 0 1993)、糖尿病性網膜症の頻度が高くなる (Yip, J. *et al.* ; *Lancet*,
 341, 369-370, 1993) という報告がある。さらに、インスリン抵抗性に
 よってプラスミノーゲン活性化因子阻害剤 1 (PAI-1) の活性が上昇し、
 血液線溶系機能を低下させたり (Potter van Loon BJ *et al.* ; *Metab.*
Clin. Exp., 42, 945-954, 1993)、粥状動脈硬化の引き金になる
 1 5 (Sato, Y. *et al.* ; *Diabetes*, 38, 91-96, 1989) という文献等も報告
 されている。

- 糖尿病は有病率が全人口の 5% を占め、日本人の約 600 万人が罹患し
 ている。糖尿病にはインスリン依存性糖尿病 (IDDM) とインスリン非依
 存性糖尿病 (NIDDM) がある。IDDM は糖尿病全体に対して約 7%、NIDDM
 2 0 は約 90% といわれ、特に、糖尿病の大多数を占める NIDDM の発症は、イン
 スリン抵抗性が重要な成因と考えられている。

- 現在までに、インスリンのシグナル伝達には細胞内蛋白質のチロシン
 リン酸化が重要な役割を演じていることが明らかとされている。インス
 リンレセプターは分子量約 135 kDa の α サブユニットと 95 kDa の β サブ
 2 5 ユニットの 2 つの糖タンパクサブユニットがジスルフィド結合によりヘ
 テロテトラマーを形成し、 $\alpha 2 \beta 2$ 構造をとる。 α サブユニットはインス

- リン結合活性を有し、 β サブユニットは自己リン酸化により活性化する
 プロテインチロシンキナーゼ (Protein Tyrosine Kinase : PTK) ドメイ
 ンを有する。すなわち、インスリンがインスリンレセプターの α 鎖に結
 合すると、インスリンレセプター β 鎖に存在するいくつかの特定のチロ
 シン残基がレセプターのチロシンキナーゼ活性により自己リン酸化され
 る。インスリンレセプターチロシンキナーゼは自己チロシンリン酸化に
 よってそのチロシンキナーゼ活性がさらに上昇する。このようにして活
 性化されたインスリンレセプターチロシンキナーゼは、細胞内に存在す
 るその基質である IRS (insulin receptor substrate) をチロシンリン
 酸化し、このチロシンリン酸化 IRS-1を Ash/Grb2やPI-3 キナーゼが認
 識して結合することによりシグナルが伝達され、最終的にグルコースの
 取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリンによる生物活性が発現
 することが明らかとされている (第9図参照、Goldstein, B. J. *et al.*
 ; *Receptor*, 3, 1-15, 1993, Kanai, F. *et al.* ; *Biochemical and*
Biophysical Research Communications, 195(2), 762-768, 1993)。しか
 し、このインスリンのシグナル伝達において、活性化されたインスリン
 レセプターを不活化する酵素、すなわちチロシン脱リン酸化酵素である
 プロテインチロシンホスファターゼ (Protein Tyrosine Phosphatase、
 以下、PTPと称する)の研究はほとんど進展していない。
- PTPに関する研究が本格的に始まったのは、1988年にFischerのグルー
 プによりヒト胎盤由来細胞質型のPTPであるPTP1Bの遺伝子がクローニン
 グされ、そのヌクレオチド配列が解明されてからである (Tonks, N. K.
et al. ; *J. Biol. Chem.*, 263, 6722-6730, 1988, Charbonneau, H.
et al. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-7186, 1988)。その
 結果、PTP1Bと相同性を示したのは既知のセリン/スレオニンホスファタ
 ーゼではなく、造血系の膜貫通分子であるCD45の細胞質内領域の2カ所で

あった。さらに、CD45がPTP活性を有していることも明らかにされた

(Tonks, N. K. *et al.* ; *Biochemistry*, 27, 8695-8701, 1988,

Charbonneau, H. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-

7186, 1988)。

- 5 現在までに多くのPTPがcDNA配列の相同性に基づいてクローニングされ、
 今なお次々と新しいPTPが報告されている (Streuli, M. *et al.* ; *J.*
Exp. Med., 168, 1523-1530, 1988, Krueger, N. X. *et al.* ; *EMBO J.*
 , 9, 3241-3252, 1990, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Biochim. Bioph*
ys. Acta, 1095, 46-56, 1991)。PTPは、(1)細胞膜貫通部分を持つ膜型
 1 0 PTP (LCA (白血球共通抗原 (Leukocyte Common Antigen)) すなわちCD
 45、LARならびにPTP α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ および ζ)と、(2)細胞膜貫通部
 分を持たない細胞質型PTP (PTP1B、TC-PTP、PTP-MEG、PTPH1、STEPおよ
 びPTP1C)とに大別される。

- 膜型PTPの多くは、細胞内に2つのPTP相同部分 (ドメイン 1およびドメ
 1 5 イン 2、第1図(a)および(b)参照) を持っている。現在までに報告され
 ているPTPには、Ile/Val-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Xaa-Arg-Ser/Thr-
 Gly (配列番号: 2) というシステインを含む配列 (signature motif) が
 ホスファターゼドメイン内に保存されている。PTP1Bのクリスタログラフ
 ィーによる研究から、この部位はPTP分子表面の小さな窪みを形成してお
 2 0 り、システインは窪みの底に位置しリン酸との結合に直接関与している
 ことが明らかにされた (Barford, D. *et al.* ; *Science*, 263, 1397-
 1404, 1994)。また、PTP1Bの酵素活性の中心の窪みにはセリンやスレオ
 ニンに結合しているリン酸は到達できないことから、窪みの深さがPTPと
 セリン/スレオニンホスファターゼの特異性を決定していることも示さ
 2 5 れた。さらに、前記signature motifの酵素活性発現における重要性は、
 変異実験から明らかにされている (Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 9,

2399-2407, 1990)。これらのことから、ドメイン 1の保存されたCysが酵素活性発現に重要であり、またドメイン2は酵素の基質特異性を決めていると考えられている。

PTP酵素群のうち、ヒト由来の LARは、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) であるCD45のホスファターゼドメインをプローブとしてヒト胎盤ゲノムライブラリーによりクローニングされた、受容体型プロテインチロシンホスファターゼである (Streuli M. *et al.* ; *J. Exp. Med.*, 168, 1553-1562, 1988)。CD45が血球系の細胞に特異的に発現しているのに対して、LARは血球系以外の細胞、特に肝臓や骨格筋などのインスリン感受性組織に発現している (Goldstein B. J. ; *Receptor*, 3, 1-15, 1993)。多くの受容体型PTPの中でLARはその細胞外ドメインが細胞接着分子と類似しているため、特に興味深い。その全構造は、Ig様ドメインとフィブロネクチンIII型ドメインよりなる 150 kDaの細胞外E-サブユニットと、膜貫通領域および、2つのホスファターゼドメインを持つ細胞内ドメインを含む 85 kDaの P-サブユニット (配列番号: 1 に示される) とが細胞膜のすぐ外側で非共有結合していることが明らかとなっている (第1図参照) (Streuli M. *et al.* ; *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992)。

現在までにLARの機能的な役割が数多く報告されている。例えば、LARが欠損した神経細胞ではニューロトロフィンへの反応性が減少し (Yang, T. *et al.* ; 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, Louisiana, USA, October 25-30, 1997, *Society for Neuroscience Abstracts*, 23, 1-2, 1997)、LAR活性の抑制によりアポリポrotein Bの分泌が減少すること (Phung, T. L. *et al.* ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(2), 367-371, 1997)、また、LARの発現が欠損することにより前脳基底部のコリ

ン作動性神経細胞のサイズが小さくなり、海馬歯状回でのコリン作動性神経支配が減少する (Yeo, T. T. *et al.* ; *J. Neurosci. Res.*, 47(3), 348-360, 1997) ことが報告されている。このように、LARは生体内で様々な役割を担っていることが徐々に明らかになってきているが、現在最も
5 注目が集められている研究として、LARとインスリン受容体との関係がある (Hashimoto, N. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 267(20), 13811-13814, 1992)。

1995年、肥満者の脂肪組織において LARのチロシンホスファターゼ活性が異常に上昇しており、これがインスリン抵抗性の発症原因として、
1 0 また、心臓血管疾患の危険因子として考えられ、注目されるべきであるとの発表が行われた (Ahmad, F. *et al.* ; *J. Clin. Invest.*, 95(6), 2806-2812, 1995)。以後、LARがインスリン受容体と密接に関与しているという報告が次々になされている (Mooney, R. A. *et al.* ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(3), 709
1 5 -712, 1997, Orr, S. R. *et al.* ; *Biochemical Society Transactions*, 25(3), 452S, 1997, Ahmad, F. *et al.* ; *J. Clin. Investigation*, 100(2), 449-458, 1997, Ahmad, F. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 272(1), 448-457, 1997, Norris, K. *et al.* ; *Febs Letters*, 415(3), 243-248, 1997, Li, P. M. *et al.* ; *Cellular Signalling*, 8(7), 467-
2 0 473, 1996)。そして、これらの情報に基づき、最近Ahmad, F. らのグループはLARおよびPTP1Bがインスリン抵抗性の治療ターゲットとして有効であると報告している (Ahmad, F. *et al.* ; *Metabolism, Clinical and Experimental*, 46(10), 1140-1145, 1997)。

現在までのLARおよびCD45等のPTPに関する研究より、細胞内情報伝達
2 5 系においてPTPがPTKと共役して極めて重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。

1992年にStreuliらのグループによって、LARのE-サブユニットとP-サブユニットの結合が非共有結合のため解離し、E-サブユニットが細胞膜表面から外れることが明らかにされた (Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 11, 3, 897-907, 1992)。しかしながら、多くの研究者は、LARの細胞外ドメインであるE-サブユニットに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を使用して様々な研究を行ってきたため、単独でもホスファターゼ活性を有するP-サブユニットは全く無視されていた。例えば、LARのホスファターゼ活性測定を意図したLAR抗体の使用において、P-サブユニットに対する抗体を用いなければ全体としてのホスファターゼ活性が測定できない。本発明者らは、これらの状況に鑑み、LARのP-サブユニット、特に細胞内ドメインに特異性を有し、且つCD45に対して特異性を有しない抗体の作製に着手した。

なお、既知のプロテインチロシンホスファターゼに対する抗体としては、CD45の膜貫通領域からホスファターゼドメイン1の一部に至る196アミノ酸残基のペプチドを抗原として調製された抗体 (Transduction Laboratories社製) およびPTP α のホスファターゼドメイン1 (260アミノ酸残基) に対する抗体 (Transduction Laboratories社製) が知られている。しかしながら、これらの抗体がLARや、その他プロテインチロシンホスファターゼのホスファターゼドメインに対して如何なる免疫特異性を有するか否かは不明である。ゆえに、CD45に特異性を有さず、LARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を作製する必要もあった。

[発明の開示]

本発明は、LARのP-サブユニット、特に細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を提供することを目的とする。さらに、本発明によって、LARのP-サブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有し、且つ他の

PTPには特異性を有しない抗体が提供される。

前記抗体は、配列番号：1で示される塩基配列によってコードされる、LARの細胞内ドメインに相当するポリペプチドまたはその断片を抗原として調製されるものが好ましく、また免疫特異性の点からモノクローナル抗体であるとよい。本発明のモノクローナル抗体として、例えばマウス／マウスのハイブリドーマにより産生される、約150 kDaの分子量を有する抗体を含むモノクローナル抗体が挙げられる。かかる抗体は、インスリンのシグナル伝達機構のさらなる解明のためのツールとして、またインスリン抵抗性およびNIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防、治療、診断等に応用できる。そして、LAR関連分子、例えば、モジュレーター、結合タンパク質などの同定や取得にも本発明の抗体が有用である。

本発明によってさらに、前記モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系が提供される。このハイブリドーマ細胞系として、本発明者によって1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された、受託番号がFERM BP-6343であるマウス／マウスハイブリドーマ細胞系YU1が挙げられる。

本発明の抗体は、天然産物由来または全体もしくは部分合成（化学合成、遺伝子組換えによる合成等）された、LARタンパク質ならびに少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片およびポリペプチド（以下、この断片およびポリペプチドを総称して「LAR由来分子」と称する）に対して特異的な免疫反応性を有する。

また、本発明によって、LARおよび／またはLAR由来分子の定量方法が提供される。この方法は、如上の抗体を使用して、被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを

含む断片もしくはポリペプチドの量を測定する工程を含むことを特徴とする。この方法において、LARまたはLAR由来分子の量を測定するために、前記抗体が、好ましくはイムノブロットティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用される。

- 5 本発明のさらなる特徴において、如上の抗体を用いて被検試料よりLARおよび／またはLAR由来分子を単離し、単離されたLARおよび／またはLAR由来分子の活性を測定する工程を含む定量方法が提供される。かかる方法において、LARおよび／またはLAR由来分子を単離するために、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび
- 10 ／または免疫沈降が好適に用いられる。すなわち、前記抗体を結合させた担体に被検試料を接触させて抗原（LAR／LAR由来分子）－抗体間の特異的な相互作用を許容し、次いで担体を洗浄した後、結合されたLAR／LAR由来分子を溶出する工程を含む、カラム法、バッチ法等によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が実施されるとよい。
- 15 い。

- 本発明の別の特徴において、如上の抗体を用いてLARおよび／またはLAR由来分子を単離する工程を含む、LARおよび／またはLAR由来分子を生産するための方法が提供される。この生産方法における目的物の単離は、上記LARおよび／またはLAR由来分子の活性を定量するための方法におけると同様に、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が好適に用いられる。
- 20

- また、本発明でさらに企図されるのは、LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認するための方法であり、この方法において、如上の抗体を用いて免疫組織学的検査が行われる。免疫組織学的検査とは、例えば、標識抗体を用いた*in situ*免疫組織染色などの技術が採用され、LARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメ
- 25

インを含む断片もしくはポリペプチドを検出するものである。

〔図面の簡単な説明〕

第1図は、LARのサブユニット構造を示す模式図(a)、および実験例にて調製したLARの膜内ホスファターゼドメイン構造の変異体を示す模式図(b)である。

第2図は、LAR C/Sとインスリンレセプターの野生型とをコトランスフェクトしたCOS細胞において、インスリン刺激により誘導されるチロシンリン酸化の時間経過を示すイムノブロットの写真である。

第3図は、LARの野生型または変異体とインスリンレセプターの野生型とをコトランスフェクトしたCOS細胞における、リン酸化－脱リン酸化を示すイムノブロットの写真である。

第4図は、LARの野生型または変異体によるインスリンレセプターβ鎖の脱リン酸化を示すイムノブロットの写真である。

第5図は、インスリンレセプターの野生型または変異型とLAR C/SとをコトランスフェクトしたCOS細胞におけるチロシンリン酸化を示すイムノブロットの写真である。

第6図は、本発明の抗体YU1の分子量を示す、SDS－ポリアクリルアミドゲルの写真である。

第7図は、本発明の抗体YU1のLARに対する免疫特異性を示すイムノブロットの写真である。

第8図は、インスリンレセプターチロシンキナーゼによるLARのリン酸化を示すイムノブロットの写真である。

第9図は、インスリンレセプターおよびLARが関与する、リン酸化および脱リン酸化によって制御されるインスリンのシグナル伝達のカスケードを示す模式図である。

先ず、LARによるインスリンのシグナル伝達制御メカニズムを明らかに

a. LAR、およびインスリンレセプターの発現ベクター

2.0 一方、インスリンレセプターの発現ベクターは、(a) IR-WT: 野生型、および(b) IR-K1018M: 野生型のインスリンレセプターのATP結合部位の、第1018位のリジンをメチオニンに変換してチロシンキナーゼ活性を欠失させたインスリンレセプター変異型の2種類の cDNAを、SR α プロモーターの下流に組み込んだもの (Kanai F. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195, 762-768, 1993を参照; 徳島大学酵素科学研究センター蛭名洋介先生より御供与) を用いた。

b. COS-7細胞へのトランスフェクション

COS-7細胞を 1.0×10^6 細胞数/8 mL/90φディッシュとなるように10% 牛胎児血清添加 RPMI 1640培地（日水製薬株式会社）に播種して 16時間 培養を行った後、LAR C/Sと IR WTの発現ベクターを DEAE-デキストラン 5 法を用いて COS-7細胞にコトランスフェクションした。用いたLAR C/Sは、 前記①(b)に記載のとおりに変異させることにより、*In vitro*でチロシン ホスファターゼ活性が完全に欠失していることが明らかにされている (Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990) ものである。

- コトランスフェクションは、以下の手順に従って行った。まず、2%
- 1 0 FCS を含有する RPMI 1640 培養液（グルタミン0.3 gおよびカナマイシ
ン0.1 gを含む、RPMI 1640培地（日水製薬株式会社） 10.2 g/L、10%
NaHCO₃でpH 7.4に調整）4 ml に、40 μ l の 10 mM クロロキンを加えた。
この溶液 2 ml に、LAR 発現ベクター5 μ gおよび IR 発現ベクター1 μ g
を加え、残りの溶液 2 ml には16 μ l の100 mg/ml DEAE-デキストランを
1 5 加えた。次いで双方の溶液をよく攪拌混合した。こうして調製した発現
ベクター溶液 3.75 ml を、 1.0×10^6 細胞数/8 ml/ディッシュ となるよ
うに播種し、37 °C、5%CO₂インキュベーター内で 16 時間前培養してお
いた COS-7細胞に加えた。前培養と同様の条件で4 時間培養した後に10
% DMSO溶液で 2 分間処理し、PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM
2 0 Na₂HPO₄·12H₂O、1.4 mM KH₂PO₄) で洗浄後、10% FCS を含有する RPMI
1640 を8 ml 加え、37 °C、5% CO₂ に調整したインキュベーター内で
48時間培養した。

c. インスリン刺激と細胞溶解液調製

- トランスフェクション終了後のCOS-7細胞を血清無添加RPMI 1640 培養
- 2 5 液中で16時間培養し、 10^{-7} Mインスリン（生化学工業社製）で一定時間、
すなわち、0、1、5、15および 30分間の刺激を行った。但し 0分刺激と

は、インスリン刺激を行ったが、氷上に放置し、37℃でインキュベートしなかったものである。インシュリン刺激開始より各時間経過後に、培養液をすべて吸い取り、直ちに PBS w/Inh. (チロシンホスファターゼインヒビター含有PBS: 1 mM バナジウム酸ナトリウム、5 mM フッ化ナトリウム、5 mM ピロリン酸ナトリウム、5 mM EDTA・2Na、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.4 mM KH₂PO₄) を5 ml 加えた。PBS w/Inh. で細胞全体を洗浄してから液体を吸引除去し、細胞に溶解用バッファー (1% Nonidet P-40、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、5 mM EDTA、10 mM ヨードアセタミド、10 mM フッ化ナトリウム、10 mM ピロリン酸ナトリウム、0.4 mM バナジウム酸ナトリウム、0.1 mM 酸化フェニルアルシン、1 mM ベンズアミジン、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル) を1ml 加え、セルスクレイパーを用いて細胞を集めた。この細胞懸濁液を 1.5 ml チューブに移し 4℃で 30 分間インキュベートすることにより、細胞を完全に溶解させた。インキュベート後の液体を12,000 rpm、4℃にて10 分間遠心分離して得られた上清を、細胞溶解液として以下の実験に用いた。

d. 免疫沈降

c. で得られた細胞溶解液につき、抗 LAR E-サブユニット抗体 (7.5 μg の 11.1A と 7.5 μg の 753.A との混合物 (Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992 参照; ハーバード大学医学部斉藤春雄教授より御供与) を用いた免疫沈降を行った。前記細胞溶解液 1 ml に対してモックとして MOPC 21 (マウス IgG1 κ: Sigma 社製) を 15 μg 加え、4℃で 1 時間インキュベート後、γ-bind (GammaBind Plus Sepharose: Pharmacia Biotech 社製) 20 μl を加え、さらに 4℃で 1 時間インキュベートすることにより前吸収を行った。4℃、12,000 rpm にて 10 分間遠心分離を行い、上清 950 μl を別のチューブに移した。抗 LAR E-サブユニット抗体

を15 μ g 加え、4 $^{\circ}$ Cで1 時間インキュベート後、 γ -bind を20 μ l加え、さらに 4 $^{\circ}$ Cで1 時間インキュベートした。12,000 rpm、4 $^{\circ}$ Cにて10 分間遠心分離後、沈査を 1 ml 溶解用バッファーで2回、PBS w/Inh. で1 回洗浄し、20 μ l のSDSサンプルバッファーに懸濁した。これを沸騰水中で

5 5分加熱し、電気泳動用の検体とした。

e. イムノブロッティング

上記検体を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、トランスファー装置を用いて400 mAで4 時間ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) に転写した。この膜を3% ウシ血清アルブミン溶液中において室温で 30 分間以上インキュベートすることによりブロッキングを行った。充分量の TBS-T (Tween 20含有TBS: 10 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で10 分間、2 回以上洗浄後、TBS-T で50,000倍に希釈した抗リン酸化チロシン抗体 (4G10、UBI社)、抗LAR E-サブユニット抗体または抗インスリンレセプター β 鎖抗体 (UBI社) を加え、室温において1 時間振盪した。充分量の TBS-T で5 分間、3 回以上洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG: Santa Cruz Biotechnology社製) 1.5 ml を含むTBS-T溶液を15 ml 加え、室温において1 時間振盪した。充分量の TBS-T で5 分間、3 回以上洗浄後、発光試薬セット (和光純薬工業株式会社製) を用いてケミルミネッセンス法により、各抗体と結合する蛋白質のバンドを検出した。

f. 結果

このように、LAR C/SとIR WTをCOS-7細胞にコトランスフェクションし、インスリンで一定時間刺激した後に作製した細胞溶解液を抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行ったところ、インスリン刺激 1分でインスリンレセプター β

鎖のチロシンリン酸化および 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認められた。これらのチロシンリン酸化は、インスリン刺激後 30分においても持続して認められた（第2図A参照）。

また、抗 LAR E-サブユニット抗体（第2図B）、抗インスリンレセプターβ鎖抗体（第2図C）および抗リン酸化チロシン抗体（第2図A）を用いたイムノブロッティングの結果、LARとインスリンレセプターがインスリンレセプターのチロシンリン酸化の有無により会合することも明らかとなった。

1 0 【実験例2】種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化の検討（1）

次に、LAR WT、LAR C/SおよびLAR DC/Sと IR WTを用いて同様に COS-7細胞にコトランスフェクションし、インスリンで 5分間刺激後、抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、沈降物について各種抗体を用いたイムノブロッティングを行った。その結果、インスリンレセプターと LAR WTをコトランスフェクションしたものは LAR C/SやLAR DC/Sをコトランスフェクションしたものと比べると、インスリンレセプターβ鎖や 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化はほとんど検出されなかった（第3図A参照）。

2 0 また、この実験において LAR（第3図C）やインスリンレセプター（第3図D）の発現量は、それぞれのトランスフェクタントにおいてほぼ同一であったことより、LAR WTはインスリンレセプターβ鎖や85 kDa蛋白質のリン酸化チロシンを脱リン酸化することが示された。

2 5 また、抗 LAR E-サブユニット抗体による免疫沈降物を抗インスリンレセプターβ鎖抗体でイムノブロッティングしたところ、LAR DC/Sをコトランスフェクションしたものでは LAR WTや LAR C/Sをコトランスフェク

クションしたものに比較すると、インスリンレセプター β 鎖のバンドが明らかに弱かった（第3図B）。

- 5 この結果は、LAR WTや LAR C/Sに比べて、LAR DC/Sとインスリンレセプターの会合が弱いことを示すものである。LAR C/Sと LAR DC/Sの違いは、ホスファターゼドメイン 2の1813番目のアミノ酸のみであることから、チロシンホスファターゼ活性を示さず基質との結合に関与すると推測されてきたこのドメイン 2が、LARとインスリンレセプターとの結合に機能していることが明らかとなった。

1 0 【実験例3】種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化の検討（2）

- さらに、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化がLARに結合したもののみであるのか、またはインスリンレセプター全てで確認されるのかを検討するために、このコトランスフェクタントの細胞溶解液を電気泳動後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った。その結果、LAR WTを導入したもののみ、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化が顕著に認められた（第4図参照）。
- 1 5

2 0 【実験例4】LAR C/S存在下でのインスリンレセプターのチロシンリン酸化の検討

- 次に、85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化がインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性によるものであるかを明らかにするため、LAR C/Sと IR WTまたはインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性を欠失させた IR K1018M (IR MT) を COS-7細胞にコトランスフェクションした。5分間インスリン刺激を行った後、抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った（第5図参照）。
- 2 5

その結果、IR WTとコトランスフェクションしたものではインスリン刺激によりインスリンレセプター β 鎖および 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認められたが、IR K1018Mとコトランスフェクションしたものではこれらのリン酸化が全く認められなかった。

- 5 以上の結果より、インスリンがインスリンレセプターに結合するとインスリンレセプターの β 鎖の速やかなチロシンリン酸化が起こり、さらにインスリンレセプターチロシンキナーゼが 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。

従って、この 85 kDa蛋白質は、インスリンレセプターと結合している
1 0 ことが確認された LARの P-サブユニットである可能性が考えられた。

[実施例 1] LARのP-サブユニットの細胞内ドメインに対する抗体の作製

以下の手順に従って、LARの細胞内ドメインに対する抗体を作製した。

a. 免疫原の調製

- 1 5 免疫原として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-LAR融合蛋白質 (GST-LAR) を用いることとした。LAR P-サブユニットの 細胞膜貫通部分の終点より細胞質側すべてにあたる 607 アミノ酸 に相当するcDNA (配列番号: 1、3467塩基対) をpGEX-2T ベクター (Pharmacia Biotech社製) のBamHI/EcoRIサイトに組み込んだ発現ベクターを用いて、
2 0 常法に従い E. coli AD202 を形質転換した。この大腸菌を LB (Amp. +)
寒天培地 (アガー7.5 gを含む後述のLB (Amp. +) 培地) で一晩培養した後、シングルコロニーをLB (Amp. +) 培地 (トリプトン10 g/L、酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L、5 N NaOH 0.2 ml/L、アンピシリンを 50 μ g / ml含有) 50 ml に接種し、さらに一晩培養した。これをLB(Amp.
2 5 +) 培地 500 mlに接種し、37°C で 600 nm における吸光度が約 1.0 になるまで培養し、1 M IPTG (イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノ

- シド、和光純薬工業社製) 50 μ l を加え、25°C で一晩培養した。この培養物を 3,000 rpm、4°C で15 分間遠心分離し、沈殿した菌体を NETN (0.5 % Nonidet P-40、1 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl) 50 ml に懸濁させた。その後、1 分間 超音波処理、氷上 1 分間の操作を 2 回繰り返す、14,000 rpm、4°C で20 分間遠心分離して上清を得た。この大腸菌溶解液 10 ml に グルタチオンセファロースビーズ懸濁液 (Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech社製) を NETNで3 回洗浄し、50%NETN懸濁液として調製) を 100 μ l 加え、室温で 30 分間インキュベートした。得られた懸濁液を3,000 rpm、4°C で5
- 1 0 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿したグルタチオンセファロースビーズをNETNで 2 回、PBSで 1 回 洗浄し、SDS sampleバッファー (125 mM Tris-HCl pH 6.8、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、5% 2-メルカプトエタノール) を100 μ l 加え、沸騰水中で10 分間加熱して GST-LAR融合蛋白質を溶出した。ビーズを除いた溶出液を、Centricon-
- 1 5 10 (アミコン社製) に移し、3,000 rpm、45分間、4°C で遠心濃縮した。緩衝化を目的として1 ml のPBSを加え、ふたたび 3,000 rpm、45分間、4°Cで遠心濃縮した。この緩衝化の操作をさらに 2 回繰り返して得られたものを、免疫用の抗原溶液とした。抗原蛋白質の精製および濃縮は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。
- 2 0 一方、最終免疫では静脈内投与を行うため、上記とは異なる方法で抗原溶液を調製した。GST-LAR融合蛋白質を発現している前記大腸菌溶解液とグルタチオンセファロースビーズをインキュベートし、遠心分離後、沈殿したビーズを NETNで2回、PBSで3回洗浄した。次いで GSH 溶出バッファー (20 mM グルタチオン、1M Tris-HCl、pH 9.6) を100 μ l加え、1
- 2 5 0分間室温で軽く攪拌して GST-LARを溶出させた。3,000 rpm、4°C で5分間遠心分離して上清を回収する操作を計 3 回行い、全溶出液を生理食塩

水中 4℃ で2日間透析したものを、静脈内投与用抗原溶液とした。

b. 免疫処置

6週齢の雌性 Balb/c マウス 8 匹に対し、プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン、Sigma社製)を 0.5 ml/匹で腹腔内投与した。2
5 週間後、腹腔内免疫用抗原溶液をフロイント完全アジュバント (GIBCO社製) と 1 : 1 で混和しエマルジョン化したものを、GST-LAR融合蛋白質が約10 μ g/匹となるよう腹腔内投与した。以後、ほぼ2週間ごとに4回、腹腔内免疫用抗原溶液とフロイント不完全アジュバント (GIBCO社製) との1 : 1 混和物をGST-LAR が約 30~70 μ g/匹となるよう調製し、腹腔
1 0 内投与した。4 回目の免疫の4日後に眼底静脈より採血し、血清中の抗体価をELISA法により測定した。

c. ELISA

静脈内免疫用抗原と同様の方法で調製した GST-LAR および GSTのみの蛋白質溶液を、それぞれ精製水に対して 4℃ で一晩透析した。これを、
1 5 PBS で 0.5 μ g / ml に調製し、50 μ l/ウェルで ELISAプレート (Falcon 3911 MicroTest \cdot TM Flexible Assay Plate) に1時間吸着させた。洗浄用バッファー (0.05% Tween20 を含む PBS) で5回洗浄後、5%スキムミルク (2.5 gのスキムミルクを 50 ml の PBS に溶解して調製) でブロッキングを行った。これを洗浄後、b で得られた血清を血清
2 0 希釈用バッファー (0.25% BSA を含む PBS) で16,000倍に希釈し、50 μ l/ウェルずつ加え、湿箱中1時間インキュベートした。プレートを洗浄後、1000 倍希釈 HRP標識抗マウスIgG抗体を50 μ l/ウェルずつ加え1 時間インキュベートした。洗浄用バッファーで 4 回、PBS で1回 洗浄後、o-フェニレンジアミン (和光純薬工業社製) をクエン酸緩衝液
2 5 (5.6325 g クエン酸一水和物、18.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を精製水に溶解し、500 mlとして調製) に 1 mg /mlの濃度で溶解させた基質溶液を 50

μl /ウェルとなるように加え、30 分間反応させた後、50 μl の 10% H_2SO_4 を加え反応を停止した。このうち 50 μl を測定用 96ウェルプレート（住友ベークライト社製）に移して450 nm の吸光度を測定した。

d. 細胞融合

- 5 上記ELISAの結果よりGST-LARに対する抗体価の上昇が認められたマウス2匹に静脈内投与により最終免疫を行い、その3日後に脾臓を摘出して、常法により脾細胞を調製した。

細胞融合のためのparent cellは、事前に 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の 8-アザグアニンを含む培地で選択し、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）欠損株であることを確認したBalb/c マウス由来ミエローマ細胞株 NS1 を用いた。NS1細胞 2×10^7 細胞数と脾細胞 1×10^8 細胞数に対し、ClonaCell（商標名）- HY Hybridoma Cloning Kit（StemCell Technologies Inc.）を用いて細胞融合、HAT 選択およびクローニングを行った。

- 1 5 クローニングされたハイブリドーマ培養上清のスクリーニングは、静脈内免疫用抗原と同様の方法で調製したGST、GST-LARまたは GST-CD45（Furukawa, T. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10928-10932, 1994）の蛋白質溶液0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を結合させたプレートにて、ハイブリドーマ培養上清50 μl について前記cにおける ELISA法に準じて行った。
- 2 0 このELISA法において、GSTまたはGST-CD45を結合させたウェルには免疫反応を示さず、GST-LARを結合させたウェルのみに免疫反応を示すハイブリドーマを選択した。なお、クローニングされたハイブリドーマの継代培養は、10% ウシ胎児血清（GIBCO社製）を含有するRPMI 1640 培養液（日水製薬社製）で行った。

- 2 5 このように、HAT選択されたハイブリドーマの培養上清を ELISA法によりスクリーニングすることによって、抗体産生能、増殖能とも安定し、

LARの細胞内ドメインに特異性を有するクローンYU1が得られた。

このハイブリドーマ細胞YU1は、1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、その受託番号は、FERM BP-6343である。

5 e. モノクローナル抗体のタイピング

上記dで得られたハイブリドーマ細胞YU1の培養上清 0.5 ml を 4.5 ml の TBS-T で希釈し、希釈液のうち 3 mlについてMouse monoclonal antibody isotyping kit (Amersham International plc. 製) を用いて、アイソタイプを調べた。その結果、抗体のアイソタイプは、IgG2b κ であった。

f. モノクローナル抗体の調製と精製

6 週齢の雌性 Balb/c マウスに対し、0.5 ml / 匹のプリスタンを経口投与し、その10 日後に、上記dのクローニングで得られたハイブリドーマ細胞YU1を、1 匹あたり $2.5 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^7$ 細胞数/0.5 ml / 匹で腹腔内へ注入した。10日後ごろから、マウスの腹部肥大を認めたため、20ゲージの注射針を用いて数回にわたり腹水を採取した。採取した腹水は、1,000 rpm、4 $^{\circ}$ Cにて5 分間遠心分離し、上清と沈殿物とに分けた。上清は、37 $^{\circ}$ Cで30 分間処理した後、4 $^{\circ}$ Cに一晩静置した。12,000 rpm、4 $^{\circ}$ Cにて10 分間遠心分離し、得られた上清 1.5 ml よりアフィニティークラムHiTrap ProteinG (Pharmacia Biotech社製) を用いてモノクローナル抗体YU1を精製した。得られた抗体溶液の280 nm における吸光度を測定し、マウスIgG の分子吸光係数より抗体濃度を算出した。

さらに、このモノクローナル抗体YU1につき、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上の移動度から見かけの分子量を明らかにした。この結果を第6図に示す。第6図に明らかなように、モノクローナル抗体YU1は、約50 kDのH鎖と、約25 kDのL鎖を含み、約150 kDの分子量を有してい

た。

[実施例2] モノクローナル抗体の特異性の検討

- 実験例1、aおよびbに記載した手順に従って、LAR WTの発現ベクターをCOS-7細胞にトランスフェクションした。その細胞溶解液について、
- 5 実施例1で得られた精製モノクローナル抗体を用いて免疫沈降後、イムノブロッティングを行った。免疫沈降での対照として、IgG1サブクラスに属する抗体（抗LAR E-サブユニット抗体（前記）および抗CD45抗体（Santa Cruz Biotechnology社製、35-Z6））に対してはMOPC 21を、モノクローナル抗体YU1に対してはマウスIgG2b κ （MOPC 195、CAPPEL社製）を用いた。
- 10 係るCOS-7細胞へのLAR強制発現系を用いた解析により、抗LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降後、モノクローナル抗体YU1は、LAR P-サブユニットに相当する85 kDaとプレカーサーに相当する約200 kDaの蛋白質を認識した（第7図B参照）。
- 15 さらに、LARをトランスフェクションしたCOS-7細胞の細胞抽出液をこれらの抗体（IgG1、IgG2b、またはYU1）により免疫沈降後、LAR E-サブユニットを認識する抗体でイムノブロッティングを行ったところ、抗体YU1で免疫沈降したもののみで、LAR E-サブユニットに相当する150 kDaと、プレカーサーに相当する約200 kDaの蛋白質が検出された（第7図
- 20 A）。以上の結果より、モノクローナル抗体YU1は、LARのP-サブユニットの免疫沈降およびイムノブロッティングに利用可能であることが明らかとなった。

[実施例3] インスリンレセプターチロシンキナーゼによるLARのリン酸化

- 25 実験例4によって、インスリンレセプターとLARのコトランスフェクションにより検出されるチロシンリン酸化された85 kDaのバンドがLARの

P-サブユニットである可能性が考えられた。

そこで実施例1にて作製したモノクローナル抗体YU1を用いて、インスリンレセプターチロシンキナーゼによりチロシンリン酸化された85 kDaの蛋白質が LAR P-サブユニットであるかの検討を、実験例1に記載したと同様の手技に基づいて行った。

LAR WTまたはLAR C/Sと IRをコトランスフェクション後、インスリンで1分間刺激したCOS-7細胞溶解液を抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降した後、抗 LAR E-サブユニット抗体と抗体YU1との混合物でイムノブロッティングすると、LARのプレカーサーと各サブユニットが検出された。

このブロットをさらに抗リン酸化チロシン抗体でリプローブしたところ、85 kDaのチロシンリン酸化バンドが LAR P-サブユニットのバンドと一致した（第8図参照）。これらの結果は、LARがインスリンレセプターの基質の一つであることを示すものである。

さらに、この LAR P-サブユニットのチロシンリン酸化は LAR WTとのコトランスフェクタントで検出されなかったことから、LARは自己脱リン酸化すると考えられた（第3図参照）。

第9図に示すように、インスリンがインスリンレセプター α 鎖に結合すると、インスリンレセプターの β 鎖が自己リン酸化されチロシンキナーゼ活性が上昇する。このチロシンキナーゼの働きにより、最終的にグルコースの取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリン作用が発現する。この活性化されたインスリンレセプターは、LARによってチロシン脱リン酸化を受けて不活性化状態に戻ることが示された。

また、インスリンレセプターチロシンキナーゼは LARの細胞内ドメインをチロシンリン酸化することが明らかとなり、このリン酸化が LARの基質特異性の決定か、ホスファターゼ活性の上昇に関与していることが推測された。そしてLARは、このリン酸化チロシンを自己脱リン酸化する

ことによりその酵素活性を制御していると考えられる。

以上の結果より、LARの酵素活性の促進がインスリン抵抗性の原因となる可能性を分子レベルで示すことができた。

5 〔産業上の利用可能性〕

本発明によって提供される、LARのP-サブユニットに対する抗体は、チロシンホスファターゼ活性を有するLARの細胞内ドメインを特異的に認識することができる。従って、この抗体は、インスリンのシグナル伝達機構を解明したり、LARのモジュレーターや結合タンパク質等を同定、取得
10 するために極めて有用なツールになり得る。また、インスリン抵抗性および NIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにはインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防および診断ならびに動脈硬化および心疾患発症の予防および診断に応用できる。

25
配 列 表

- (1) 出願人名称：扶桑薬品工業株式会社
- (2) 発明の名称：LARのチロシンホスファターゼサブユニットに対する抗体
- (3) 書類記号：9 8 P 0 6 6 W O
- (4) 優先権のもととなった出願をした国名および出願番号：
国 名：
出願番号：
- (5) 優 先 日：
- (6) 配列の数：3

配列番号：1

配列の長さ：3467

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：

生物名：ヒト

組織の種類：胎盤

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：6..1826

特徴を決定した方法：E

配列の特徴：

特徴を表す記号：domain

存在位置 : 213..953

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : チロシンホスファターゼドメイン1

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 1080..1826

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : チロシンホスファターゼドメイン2

配列 :

GATCC GGA CTG AAG GAC TCC TTG CTG GCC CAC TCC TCT GAC CCT GTG GAG	50
Gly Leu Lys Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu	
1 5 10 15	
ATG CGG AGG CTC AAC TAC CAG ACC CCA GGT ATG CGA GAC CAC CCA CCC	98
Met Arg Arg Leu Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro	
20 25 30	
ATC CCC ATC ACC GAC CTG GCG GAC AAC ATC GAG CGC CTC AAA GCC AAC	146
Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn	
35 40 45	
GAT GGC CTC AAG TTC TCC CAG GAG TAT GAG TCC ATC GAC CCT GGA CAG	194
Asp Gly Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln	
50 55 60	
CAG TTC ACG TGG GAG AAT TCA AAC CTG GAG GTG AAC AAG CCC AAG AAC	242
Gln Phe Thr Trp Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn	
65 70 75	

CAG TTT CAG TTC ATG GCC TGG CCA GAC CAT GGA GTT CCT GAG TAC CCA	674
Gln Phe Gln Phe Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro	
210 215 220	
ACT CCC ATC CTG GCC TTC CTA CGA CGG GTC AAG GCC TGC AAC CCC CTA	722
Thr Pro Ile Leu Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu	
225 230 235	
GAC GCA GGG CCC ATG GTG GTG CAC TGC AGC GCG GGC GTG GGC CGC ACC	770
Asp Ala Gly Pro Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr	
240 245 250 255	
GGC TGC TTC ATC GTG ATT GAT GCC ATG TTG GAG CGG ATG AAG CAC GAG	818
Gly Cys Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu	
260 265 270	
AAG ACG GTG GAC ATC TAT GGC CAC GTG ACC TGC ATG CGA TCA CAG AGG	866
Lys Thr Val Asp Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg	
275 280 285	
AAC TAC ATG GTG CAG ACG GAG GAC CAG TAC GTG TTC ATC CAT GAG GCG	914
Asn Tyr Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala	
290 295 300	
CTG CTG GAG GCT GCC ACG TGC GGC CAC ACA GAG GTG CCT GCC CGC AAC	962
Leu Leu Glu Ala Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn	
305 310 315	
CTG TAT GCC CAC ATC CAG AAG CTG GGC CAA GTG CCT CCA GGG GAG AGT	1010
Leu Tyr Ala His Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser	
320 325 330 335	

GTG ACC GCC ATG GAG CTC GAG TTC AAG TTG CTG GCC AGC TCC AAG GCC	1058
Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala	
340 345 350	
CAC ACG TCC CGC TTC ATC AGC GCC AAC CTG CCC TGC AAC AAG TTC AAG	1106
His Thr Ser Arg Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys	
355 360 365	
AAC CGG CTG GTG AAC ATC ATG CCC TAC GAA TTG ACC CGT GTG TGT CTG	1154
Asn Arg Leu Val Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu	
370 375 380	
CAG CCC ATC CGT GGT GTG GAG GGC TCT GAC TAC ATC AAT GCC AGC TTC	1202
Gln Pro Ile Arg Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe	
385 390 395	
CTG GAT GGT TAT AGA CAG CAG AAG GCC TAC ATA GCT ACA CAG GGG CCT	1250
Leu Asp Gly Tyr Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro	
400 405 410 415	
CTG GCA GAG AGC ACC GAG GAC TTC TGG CGC ATG CTA TGG GAG CAC AAT	1298
Leu Ala Glu Ser Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn	
420 425 430	
TCC ACC ATC ATC GTC ATG CTG ACC AAG CTT CGG GAG ATG GGC AGG GAG	1346
Ser Thr Ile Ile Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu	
435 440 445	
AAA TGC CAC CAG TAC TGG CCA GCA GAG CGC TCT GCT CGC TAC CAG TAC	1394
Lys Cys His Gln Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr	
450 455 460	

TTT GTT GTT GAC CCG ATG GCT GAG TAC AAC ATG CCC CAG TAT ATC CTG	1442
Phe Val Val Asp Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu	
465 470 475	
CGT GAG TTC AAG GTC ACG GAT GCC CGG GAT GGG CAG TCA AGG ACA ATC	1490
Arg Glu Phe Lys Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile	
480 485 490 495	
CGG CAG TTC CAG TTC ACA GAC TGG CCA GAG CAG GGC GTG CCC AAG ACA	1538
Arg Gln Phe Gln Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr	
500 505 510	
GGC GAG GGA TTC ATT GAC TTC ATC GGG CAG GTG CAT AAG ACC AAG GAG	1586
Gly Glu Gly Phe Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu	
515 520 525	
CAG TTT GGA CAG GAT GGG CCT ATC ACG GTG CAC TGC AGT GCT GGC GTG	1634
Gln Phe Gly Gln Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val	
530 535 540	
GGC CGC ACC GGG GTG TTC ATC ACT CTG AGC ATC GTC CTG GAG CGC ATG	1682
Gly Arg Thr Gly Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met	
545 550 555	
CGC TAT GAG GGC GTG GTC GAC ATG TTT CAG ACC GTG AAG ACC CTG CGT	1730
Arg Tyr Glu Gly Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg	
560 565 570 575	
ACA CAG CGT CCT GCC ATG GTG CAG ACA GAG GAC CAG TAT CAG CTG TGC	1778
Thr Gln Arg Pro Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys	
580 585 590	

TAC CGT GCG GCC CTG GAG TAC CTC GGC AGC TTT GAC CAC TAT GCA ACG 1826
 Tyr Arg Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr
 595 600 605
 TAACTACCGC TCCCCTCTCC TCCGCCACCC CCGCCGTGGG GCTCCGGAGG GGACCCAGCT 1886
 CCTCTGAGCC ATACCGACCA TCGTCCAGCC CTCCTACGCA GATGCTGTCA CTGGCAGAGC 1946
 ACAGCCCACG GGGATCACAG CGTTTCAGGA ACGTTGCCAC ACCAATCAGA GAGCCTAGAA 2006
 CATCCCTGGG CAAGTGGATG GCCCAGCAGG CAGGCACTGT GGCCCTTCTG TCCACCAGAC 2066
 CCACCTGGAG CCCGCTTCAA GCTCTCTGTT GCGCTCCCGC ATTTCTCATG CTTCTTCTCA 2126
 TGGGGTGGGG TTGGGGCAAA GCCTCCTTTT TAATACATTA AGTGGGGTAG ACTGAGGGAT 2186
 TTTAGCCTCT TCCCTCTGAT TTTTCCTTTC GCGAATCCGT ATCTGCAGAA TGGGCCACTG 2246
 TAGGGGTGGG GGTTTATTTT GTTTTGTTTT TTTTTTTTTT TTGTATGACT TCTGCTGAAG 2306
 GACAGAACAT TGCCTTCCTC GTGCAGAGCT GGGGCTGCCA GCCTGAGCGG AGGCTCGGCC 2366
 GTGGGCCGGG AGGCAGTGCT GATCCGGCTG CTCCTCCAGC CCTTCAGACG AGATCCTGTT 2426
 TCAGCTAAAT GCAGGGAAC TCAATGTTTT TTTAAGTTTT GTTTTCCCTT TAAAGCCTTT 2486
 TTTTAGGCCA CATTGACAGT GGTGGGCGGG GAGAAGATAG GGAACACTCA TCCCTGGTCG 2546
 TCTATCCCAG TGTGTGTTTA ACATTCACAG CCCAGAACCA CAGATGTGTC TGGGAGAGCC 2606
 TGGCAAGGCA TTCCTCATCA CCATCGTGTT TGCAAAGGTT AAAACAAAAA CAAAAACCA 2666
 CAAAAATAAA AAACAAAAAA AACAAAAAAC CAAAAAAAAG AAAAAAAAAG AGTCAGCCCT 2726
 TGGCTTCTGC TTCAAACCCT CAAGAGGGGA AGCAACTCCG TGTGCCTGGG GTTCCCGAGG 2786
 GAGCTGCTGG CTGACCTGGG CCCACAGAGC CTGGCTTTGG TCCCCAGCAT TGCAGTATGG 2846
 TGTGGTGTTC GTAGGCTGTG GGGTCTGGCT GTGTGGCCAA GGTGAATAGC ACAGGTAGG 2906
 GTGTGTGCCA CACCCCATGC ACCTCAGGGC CAAGCGGGGG CGTGGCTGGC CTTTCAGGTC 2966
 CAGGCCAGTG GGCCTGGTAG CACATGTCTG TCCTCAGAGC AGGGGCCAGA TGATTTTCCT 3026
 CCCTGGTTTG CAGCTGTTTT CAAAGCCCCC GATAATCGCT CTTTCCACT CCAAGATGCC 3086
 CTCATAAACC AATGTGGCAA GACTACTGGA CTTCTATCAA TGGTACTCTA ATCAGTCCTT 3146
 ATTATCCCAG CTTGCTGAGG GGCAGGGAGA GCGCCTCTTC CTCTGGGCAG CGCTATCTAG 3206

ATAGGTAAGT GGGGGCGGGG AAGGGTGCAT AGCTGTTTTA GCTGAGGGAC GTGGTGCCGA 3266
 CGTCCCCAAA CCTAGCTAGG CTAAGTCAAG ATCAACATTC CAGGGTTGGT AATGTTGGAT 3326
 GATGAAACAT TCATTTTTTAC CTTGTGGATG CTAGTGCTGT AGAGTTCACT GTTGTACACA 3386
 GTCTGTTTTT TATTTGTTAA GAAAACTAC AGCATCATTG CATAATTCTT GATGGTAATA 3446
 AATTTGAATA ATCAGATTTT T 3467

配列番号：2

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

他の情報：第1位のアミノ酸XaaはIleまたはValである。

配列の特徴：

他の情報：第10位のアミノ酸XaaはSerまたはThrである。

配列：

Xaa His Cys Xaa Ala Gly Xaa Xaa Arg Xaa Gly

11

配列番号：3

配列の長さ：7702

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：

生物名：ヒト

組織の種類：胎盤

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：371..6064

特徴を決定した方法：E

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：371..418

特徴を決定した方法：E

配列の特徴：

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：419..6061

特徴を決定した方法：E

配列の特徴：

特徴を表す記号：domain

存在位置：419..4120

特徴を決定した方法：S

他の情報：細胞外ドメイン

配列の特徴：

特徴を表す記号：domain

存在位置：4121..4192

特徴を決定した方法：S

他の情報：膜貫通ドメイン

配列の特徴：

特徴を表す記号：domain

存在位置：4193..6061

特徴を決定した方法：S

他の情報：細胞内ドメイン

配列：

```

CGGGAGCGGC GGGAGCGGTG GCGGCGGCAG AGGCGGCGGC TCCAGCTTCG GCTCCGGCTC   60
GGGCTCGGGC TCCGGCTCCG GCTCCGGCTC CGGCTCCAGC TCGGGTGGCG GTGGCGGGAG  120
CGGGACCAGG TGGAGGCGGC GGCGGCAGAG GAGTGGGAGC AGCGGCCCTA GCGGCTTGCG  180
GGGGGACATG CGGACCGACG GCCCCTGGAT AGGCGGAAGG AGTGGAGGCC CTGGTGCCCCG  240
GCCCTTGGTG CTGAGTATCC AGCAAGAGTG ACCGGGGTGA AGAAGCAAAG ACTCGGTTGA  300
TTGTCCTGGG CTGTGGCTGG CTGTGGAGCT AGAGCCCTGG ATGGCCCCTG AGCCAGCCCC  360
AGGGAGGACG ATG GTG CCC CTT GTG CCT GCA CTG GTG ATG CTT GGT TTG   409

      Met Val Pro Leu Val Pro Ala Leu Val Met Leu Gly Leu
            -15                -10                -5

GTG GCA GGC GCC CAT GGT GAC AGC AAA CCT GTC TTC ATT AAA GTC CCT   457
Val Ala Gly Ala His Gly Asp Ser Lys Pro Val Phe Ile Lys Val Pro
            1                5                10

GAG GAC CAG ACT GGG CTG TCA GGA GGG GTA GCC TCC TTC GTG TGC CAA   505
Glu Asp Gln Thr Gly Leu Ser Gly Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Gln
            15                20                25

GCT ACA GGA GAA CCC AAG CCG CGC ATC ACA TGG ATG AAG AAG GGG AAG   553
Ala Thr Gly Glu Pro Lys Pro Arg Ile Thr Trp Met Lys Lys Gly Lys
            30                35                40

AAA GTC AGC TCC CAG CGC TTC GAG GTC ATT GAG TTT GAT GAT GGG GCA   601
Lys Val Ser Ser Gln Arg Phe Glu Val Ile Glu Phe Asp Asp Gly Ala
            45                50                55                60

```

35

GGG TCA GTG CTT CGG ATC CAG CCA TTG CGG GTG CAG CGA GAT GAA GCC 649
 Gly Ser Val Leu Arg Ile Gln Pro Leu Arg Val Gln Arg Asp Glu Ala

65

70

75

ATC TAT GAG TGT ACA GCT ACT AAC AGC CTG GGT GAG ATC AAC ACT AGT 697
 Ile Tyr Glu Cys Thr Ala Thr Asn Ser Leu Gly Glu Ile Asn Thr Ser

80

85

90

GCC AAG CTC TCA GTG CTC GAA GAG GAA CAG CTG CCC CCT GGG TTC CCT 745
 Ala Lys Leu Ser Val Leu Glu Glu Glu Gln Leu Pro Pro Gly Phe Pro

95

100

105

TCC ATC GAC ATG GGG CCT CAG CTG AAG GTG GTG GAG AAG GCA CGC ACA 793
 Ser Ile Asp Met Gly Pro Gln Leu Lys Val Val Glu Lys Ala Arg Thr

110

115

120

GCC ACC ATG CTA TGT GCC GCA GGC GGA AAT CCA GAC CCT GAG ATT TCT 841
 Ala Thr Met Leu Cys Ala Ala Gly Gly Asn Pro Asp Pro Glu Ile Ser

125

130

135

140

TGG TTC AAG GAC TTC CTT CCT GTA GAC CCT GCC ACG AGC AAC GGC CGC 889
 Trp Phe Lys Asp Phe Leu Pro Val Asp Pro Ala Thr Ser Asn Gly Arg

145

150

155

ATC AAG CAG CTG CGT TCA GGT GCC TTG CAG ATA GAG AGC AGT GAG GAA 937
 Ile Lys Gln Leu Arg Ser Gly Ala Leu Gln Ile Glu Ser Ser Glu Glu

160

165

170

TCC GAC CAA GGC AAG TAC GAG TGT GTG GCG ACC AAC TCG GCA GGC ACA 985
 Ser Asp Gln Gly Lys Tyr Glu Cys Val Ala Thr Asn Ser Ala Gly Thr

175

180

185

CGT TAC TCA GCC CCT GCG AAC CTG TAT GTG CGA GTG CGC CGC GTG GCT	1033
Arg Tyr Ser Ala Pro Ala Asn Leu Tyr Val Arg Val Arg Arg Val Ala	
190 195 200	
CCT CGT TTC TCC ATC CCT CCC AGC AGC CAG GAG GTG ATG CCA GGC GGC	1081
Pro Arg Phe Ser Ile Pro Pro Ser Ser Gln Glu Val Met Pro Gly Gly	
205 210 215 220	
AGC GTG AAC CTG ACA TGC GTG GCA GTG GGT GCA CCC ATG CCC TAC GTG	1129
Ser Val Asn Leu Thr Cys Val Ala Val Gly Ala Pro Met Pro Tyr Val	
225 230 235	
AAG TGG ATG ATG GGG GCC GAG GAG CTC ACC AAG GAG GAT GAG ATG CCA	1177
Lys Trp Met Met Gly Ala Glu Glu Leu Thr Lys Glu Asp Glu Met Pro	
240 245 250	
GTT GGC CGC AAC GTC CTG GAG CTC AGC AAT GTC GTA CGC TCT GCC AAC	1225
Val Gly Arg Asn Val Leu Glu Leu Ser Asn Val Val Arg Ser Ala Asn	
255 260 265	
TAC ACC TGT GTG GCC ATC TCC TCG CTG GGC ATG ATC GAG GCC ACA GCC	1273
Tyr Thr Cys Val Ala Ile Ser Ser Leu Gly Met Ile Glu Ala Thr Ala	
270 275 280 285	
CAG GTC ACA GTG AAA GCT CTT CCA AAG CCT CCG ATT GAT CTT GTG GTG	1321
Gln Val Thr Val Lys Ala Leu Pro Lys Pro Pro Ile Asp Leu Val Val	
290 295 300	
ACA GAG ACA ACT GCC ACC AGT GTC ACC CTC ACC TGG GAC TCT GGC AAC	1369
Thr Glu Thr Thr Ala Thr Ser Val Thr Leu Thr Trp Asp Ser Gly Asn	
305 310 315	

TCG GAG CCT GTA ACC TAC TAT GGC ATC CAG TAC CGC GCA GCG GGC ACG	1417
Ser Glu Pro Val Thr Tyr Tyr Gly Ile Gln Tyr Arg Ala Ala Gly Thr	
320 325 330	
GAG GGC CCC TTT CAG GAG GTG GAT GGT GTG GCC ACC ACC CGC TAC AGC	1465
Glu Gly Pro Phe Gln Glu Val Asp Gly Val Ala Thr Thr Arg Tyr Ser	
335 340 345	
ATT GGC GGC CTC AGC CCT TTC TCG GAA TAT GCC TTC CGC GTG CTG GCG	1513
Ile Gly Gly Leu Ser Pro Phe Ser Glu Tyr Ala Phe Arg Val Leu Ala	
350 355 360 365	
GTG AAC AGC ATC GGG CGA GGG CCG CCC AGC GAG GCA GTG CGG GCA CGC	1561
Val Asn Ser Ile Gly Arg Gly Pro Pro Ser Glu Ala Val Arg Ala Arg	
370 375 380	
ACG GGA GAA CAG GCG CCC TCC AGC CCA CCG CGC CGC GTG CAG GCA CGC	1609
Thr Gly Glu Gln Ala Pro Ser Ser Pro Pro Arg Arg Val Gln Ala Arg	
385 390 395	
ATG CTG AGC GCC AGC ACC ATG CTG GTG CAG TGG GAG CCT CCC GAG GAG	1657
Met Leu Ser Ala Ser Thr Met Leu Val Gln Trp Glu Pro Pro Glu Glu	
400 405 410	
CCC AAC GGC CTG GTG CGG GGA TAC CGC GTC TAC TAT ACT CCG GAC TCC	1705
Pro Asn Gly Leu Val Arg Gly Tyr Arg Val Tyr Tyr Thr Pro Asp Ser	
415 420 425	
CGC CGC CCC CCG AAC GCC TGG CAC AAG CAC AAC ACC GAC GCG GGG CTC	1753
Arg Arg Pro Pro Asn Ala Trp His Lys His Asn Thr Asp Ala Gly Leu	
430 435 440 445	

CTC ACG ACC GTG GGC AGC CTG CTG CCT GGC ATC ACC TAC AGC CTG CGC 1801
 Leu Thr Thr Val Gly Ser Leu Leu Pro Gly Ile Thr Tyr Ser Leu Arg
 450 455 460
 GTG CTT GCC TTC ACC GCC GTG GGC GAT GGC CCT CCC AGC CCC ACC ATC 1849
 Val Leu Ala Phe Thr Ala Val Gly Asp Gly Pro Pro Ser Pro Thr Ile
 465 470 475
 CAG GTC AAG ACG CAG CAG GGA GTG CCT GCC CAG CCC GCG GAC TTC CAG 1897
 Gln Val Lys Thr Gln Gln Gly Val Pro Ala Gln Pro Ala Asp Phe Gln
 480 485 490
 GCC GAG GTG GAG TCG GAC ACC AGG ATC CAG CTC TCG TGG CTG CTG CCC 1945
 Ala Glu Val Glu Ser Asp Thr Arg Ile Gln Leu Ser Trp Leu Leu Pro
 495 500 505
 CCT CAG GAG CGG ATC ATC ATG TAT GAA CTG GTG TAC TGG GCG GCA GAG 1993
 Pro Gln Glu Arg Ile Ile Met Tyr Glu Leu Val Tyr Trp Ala Ala Glu
 510 515 520 525
 GAC GAA GAC CAA CAG CAC AAG GTC ACC TTC GAC CCA ACC TCC TCC TAC 2041
 Asp Glu Asp Gln Gln His Lys Val Thr Phe Asp Pro Thr Ser Ser Tyr
 530 535 540
 ACA CTA GAG GAC CTG AAG CCT GAC ACA CTC TAC CGC TTC CAG CTG GCT 2089
 Thr Leu Glu Asp Leu Lys Pro Asp Thr Leu Tyr Arg Phe Gln Leu Ala
 545 550 555
 GCA CGC TCG GAT ATG GGG GTG GGC GTC TTC ACC CCC ACC ATT GAG GCC 2137
 Ala Arg Ser Asp Met Gly Val Gly Val Phe Thr Pro Thr Ile Glu Ala
 560 565 570

CGC ACA GCC CAG TCC ACC CCC TCC GCC CCT CCC CAG AAG GTG ATG TGT 2185
 Arg Thr Ala Gln Ser Thr Pro Ser Ala Pro Pro Gln Lys Val Met Cys
 575 580 585
 GTG AGC ATG GGC TCC ACC ACG GTC CGG GTA AGT TGG GTC CCG CCG CCT 2233
 Val Ser Met Gly Ser Thr Thr Val Arg Val Ser Trp Val Pro Pro Pro
 590 595 600 605
 GCC GAC AGC CGC AAC GGC GTT ATC ACC CAG TAC TCC GTG GCC CAC GAG 2281
 Ala Asp Ser Arg Asn Gly Val Ile Thr Gln Tyr Ser Val Ala His Glu
 610 615 620
 GCG GTG GAC GGC GAG GAC CGC GGG CGG CAT GTG GTG GAT GGC ATC AGC 2329
 Ala Val Asp Gly Glu Asp Arg Gly Arg His Val Val Asp Gly Ile Ser
 625 630 635
 CGT GAG CAC TCC AGC TGG GAC CTG GTG GGC CTG GAG AAG TGG ACG GAG 2377
 Arg Glu His Ser Ser Trp Asp Leu Val Gly Leu Glu Lys Trp Thr Glu
 640 645 650
 TAC CGG GTG TGG GTG CGG GCA CAC ACA GAC GTG GGC CCC GGC CCC GAG 2425
 Tyr Arg Val Trp Val Arg Ala His Thr Asp Val Gly Pro Gly Pro Glu
 655 660 665
 AGC AGC CCG GTG CTG GTG CGC ACC GAT GAG GAC GTG CCC AGC GGG CCT 2473
 Ser Ser Pro Val Leu Val Arg Thr Asp Glu Asp Val Pro Ser Gly Pro
 670 675 680 685
 CCG CGG AAG GTG GAG GTG GAG CCA CTG AAC TCC ACT GCT GTG CAT GTC 2521
 Pro Arg Lys Val Glu Val Glu Pro Leu Asn Ser Thr Ala Val His Val
 690 695 700

TAC TGG AAG CTG CCT GTC CCC AGC AAG CAG CAT GGC CAG ATC CGC GGC	2569
Tyr Trp Lys Leu Pro Val Pro Ser Lys Gln His Gly Gln Ile Arg Gly	
705 710 715	
TAC CAG GTC ACC TAC GTG CGG CTG GAG AAT GGC GAG CCC CGT GGA CTC	2617
Tyr Gln Val Thr Tyr Val Arg Leu Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Leu	
720 725 730	
CCC ATC ATC CAA GAC GTC ATG CTA GCC GAG GCC CAG TGG CGG CCA GAG	2665
Pro Ile Ile Gln Asp Val Met Leu Ala Glu Ala Gln Trp Arg Pro Glu	
735 740 745	
GAG TCC GAG GAC TAT GAA ACC ACT ATC AGC GGC CTG ACC CCG GAG ACC	2713
Glu Ser Glu Asp Tyr Glu Thr Thr Ile Ser Gly Leu Thr Pro Glu Thr	
750 755 760 765	
ACC TAC TCC GTT ACT GTT GCT GCC TAT ACC ACC AAG GGG GAT GGT GCC	2761
Thr Tyr Ser Val Thr Val Ala Ala Tyr Thr Thr Lys Gly Asp Gly Ala	
770 775 780	
CGC AGC AAG CCC AAA ATT GTC ACT ACA ACA GGT GCA GTC CCA GGC CGG	2809
Arg Ser Lys Pro Lys Ile Val Thr Thr Thr Gly Ala Val Pro Gly Arg	
785 790 795	
CCC ACC ATG ATG ATC AGC ACC ACG GCC ATG AAC ACT GCG CTG CTC CAG	2857
Pro Thr Met Met Ile Ser Thr Thr Ala Met Asn Thr Ala Leu Leu Gln	
800 805 810	
TGG CAC CCA CCC AAG GAA CTG CCT GGC GAG CTG CTG GGC TAC CGG CTG	2905
Trp His Pro Pro Lys Glu Leu Pro Gly Glu Leu Leu Gly Tyr Arg Leu	
815 820 825	

CAG TAC TGC CGG GCC GAC GAG GCG CGG CCC AAC ACC ATA GAT TTC GGC	2953
Gln Tyr Cys Arg Ala Asp Glu Ala Arg Pro Asn Thr Ile Asp Phe Gly	
830 835 840 845	
AAG GAT GAC CAG CAC TTC ACA GTC ACC GGC CTG CAC AAG GGG ACC ACC	3001
Lys Asp Asp Gln His Phe Thr Val Thr Gly Leu His Lys Gly Thr Thr	
850 855 860	
TAC ATC TTC CGG CTT GCT GCC AAG AAC CGG GCT GGC TTG GGT GAG GAG	3049
Tyr Ile Phe Arg Leu Ala Ala Lys Asn Arg Ala Gly Leu Gly Glu Glu	
865 870 875	
TTC GAG AAG GAG ATC AGG ACC CCC GAG GAC CTG CCC AGC GGC TTC CCC	3097
Phe Glu Lys Glu Ile Arg Thr Pro Glu Asp Leu Pro Ser Gly Phe Pro	
880 885 890	
CAA AAC CTG CAT GTG ACA GGA CTG ACC ACG TCT ACC ACA GAA CTG GCC	3145
Gln Asn Leu His Val Thr Gly Leu Thr Thr Ser Thr Thr Glu Leu Ala	
895 900 905	
TGG GAC CCG CCA GTG CTG GCG GAG AGG AAC GGG CGC ATC ATC AGC TAC	3193
Trp Asp Pro Pro Val Leu Ala Glu Arg Asn Gly Arg Ile Ile Ser Tyr	
910 915 920 925	
ACC GTG GTG TTC CGA GAC ATC AAC AGC CAA CAG GAG CTG CAG AAC ATC	3241
Thr Val Val Phe Arg Asp Ile Asn Ser Gln Gln Glu Leu Gln Asn Ile	
930 935 940	
ACG ACA GAC ACC CGC TTT ACC CTT ACT GGC CTC AAG CCA GAC ACC ACT	3289
Thr Thr Asp Thr Arg Phe Thr Leu Thr Gly Leu Lys Pro Asp Thr Thr	
945 950 955	

TAC GAC ATC AAG GTC CGC GCA TGG ACC AGC AAA GGC TCT GGC CCA CTC	3337
Tyr Asp Ile Lys Val Arg Ala Trp Thr Ser Lys Gly Ser Gly Pro Leu	
960 965 970	
AGC CCC AGC ATC CAG TCC CGG ACC ATG CCG GTG GAG CAA GTG TTT GCC	3385
Ser Pro Ser Ile Gln Ser Arg Thr Met Pro Val Glu Gln Val Phe Ala	
975 980 985	
AAG AAC TTC CGG GTG GCG GCT GCA ATG AAG ACG TCT GTG CTG CTC AGC	3433
Lys Asn Phe Arg Val Ala Ala Ala Met Lys Thr Ser Val Leu Leu Ser	
990 995 1000 1005	
TGG GAG GTT CCC GAC TCC TAT AAG TCA GCT GTG CCC TTT AAG ATT CTG	3481
Trp Glu Val Pro Asp Ser Tyr Lys Ser Ala Val Pro Phe Lys Ile Leu	
1010 1015 1020	
TAC AAT GGG CAG AGT GTG GAG GTG GAC GGG CAC TCG ATG CGG AAG CTG	3529
Tyr Asn Gly Gln Ser Val Glu Val Asp Gly His Ser Met Arg Lys Leu	
1025 1030 1035	
ATC GCA GAC CTG CAG CCC AAC ACA GAG TAC TCG TTT GTG CTG ATG AAC	3577
Ile Ala Asp Leu Gln Pro Asn Thr Glu Tyr Ser Phe Val Leu Met Asn	
1040 1045 1050	
CGT GGC AGC AGC GCA GGG GGC CTG CAG CAC CTG GTG TCC ATC CGC ACA	3625
Arg Gly Ser Ser Ala Gly Gly Leu Gln His Leu Val Ser Ile Arg Thr	
1055 1060 1065	
GCC CCC GAC CTC CTG CCT CAC AAG CCG CTG CCT GCC TCT GCC TAC ATA	3673
Ala Pro Asp Leu Leu Pro His Lys Pro Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile	
1070 1075 1080 1085	

GAG GAC GGC CGC TTC GAT CTC TCC ATG CCC CAT GTG CAA GAC CCC TCG 3721

Glu Asp Gly Arg Phe Asp Leu Ser Met Pro His Val Gln Asp Pro Ser

1090

1095

1100

CTT GTC AGG TGG TTC TAC ATT GTT GTG GTA CCC ATT GAC CGT GTG GGC 3769

Leu Val Arg Trp Phe Tyr Ile Val Val Val Pro Ile Asp Arg Val Gly

1105

1110

1115

GGG AGC ATG CTG ACG CCA AGG TGG AGC ACA CCC GAG GAA CTG GAG CTG 3817

Gly Ser Met Leu Thr Pro Arg Trp Ser Thr Pro Glu Glu Leu Glu Leu

1120

1125

1130

GAC GAG CTT CTA GAA GCC ATC GAG CAA GGC GGA GAG GAG CAG CGG CGG 3865

Asp Glu Leu Leu Glu Ala Ile Glu Gln Gly Gly Glu Glu Gln Arg Arg

1135

1140

1145

CGG CGG CGG CAG GCA GAA CGT CTG AAG CCA TAT GTG GCT GCT CAA CTG 3913

Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Leu Lys Pro Tyr Val Ala Ala Gln Leu

1150

1155

1160

1165

GAT GTG CTC CCG GAG ACC TTT ACC TTG GGG GAC AAG AAG AAC TAC CGG 3961

Asp Val Leu Pro Glu Thr Phe Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asn Tyr Arg

1170

1175

1180

GGC TTC TAC AAC CGG CCC CTG TCT CCG GAC TTG AGC TAC CAG TGC TTT 4009

Gly Phe Tyr Asn Arg Pro Leu Ser Pro Asp Leu Ser Tyr Gln Cys Phe

1185

1190

1195

GTG CTT GCC TCC TTG AAG GAA CCC ATG GAC CAG AAG CGC TAT GCC TCC 4057

Val Leu Ala Ser Leu Lys Glu Pro Met Asp Gln Lys Arg Tyr Ala Ser

1200

1205

1210

AGC CCC TAC TCG GAT GAG ATC GTG GTC CAG GTG ACA CCA GCC CAG CAG	4105
Ser Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Val Val Gln Val Thr Pro Ala Gln Gln	
1215 1220 1225	
CAG GAG GAG CCG GAG ATG CTG TGG GTG ACG GGT CCC GTG CTG GCA GTC	4153
Gln Glu Glu Pro Glu Met Leu Trp Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Val	
1230 1235 1240 1245	
ATC CTC ATC ATC CTC ATT GTC ATC GCC ATC CTC TTG TTC AAA AGG AAA	4201
Ile Leu Ile Ile Leu Ile Val Ile Ala Ile Leu Leu Phe Lys Arg Lys	
1250 1255 1260	
AGG ACC CAC TCT CCG TCC TCT AAG GAT GAG CAG TCG ATC GGA CTG AAG	4249
Arg Thr His Ser Pro Ser Ser Lys Asp Glu Gln Ser Ile Gly Leu Lys	
1265 1270 1275	
GAC TCC TTG CTG GCC CAC TCC TCT GAC CCT GTG GAG ATG CGG AGG CTC	4297
Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu Met Arg Arg Leu	
1280 1285 1290	
AAC TAC CAG ACC CCA GGT ATG CGA GAC CAC CCA CCC ATC CCC ATC ACC	4345
Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro Ile Pro Ile Thr	
1295 1300 1305	
GAC CTG GCG GAC AAC ATC GAG CGC CTC AAA GCC AAC GAT GGC CTC AAG	4393
Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys	
1310 1315 1320 1325	
TTC TCC CAG GAG TAT GAG TCC ATC GAC CCT GGA CAG CAG TTC ACG TGG	4441
Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln Gln Phe Thr Trp	
1330 1335 1340	

GAG AAT TCA AAC CTG GAG GTG AAC AAG CCC AAG AAC CGC TAT GCG AAT	4489
Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn Arg Tyr Ala Asn	
1345	1350
1355	
GTC ATC GCC TAC GAC CAC TCT CGA GTC ATC CTT ACC TCT ATC GAT GGC	4537
Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr Ser Ile Asp Gly	
1360	1365
1370	
GTC CCC GGG AGT GAC TAC ATC AAT GCC AAC TAC ATC GAT GGC TAC CGC	4585
Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Asp Gly Tyr Arg	
1375	1380
1385	
AAG CAG AAT GCC TAC ATC GCC ACG CAG GGC CCC CTG CCC GAG ACC ATG	4633
Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Glu Thr Met	
1390	1395
1400	1405
GGC GAT TTC TGG AGA ATG GTG TGG GAA CAG CGC ACG GCC ACT GTG GTC	4681
Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Val Val	
1410	1415
1420	
ATG ATG ACA CGG CTG GAG GAG AAG TCC CGG GTA AAA TGT GAT CAG TAC	4729
Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys Cys Asp Gln Tyr	
1425	1430
1435	
TGG CCA GCC CGT GGC ACC GAG ACC TGT GGC CTT ATT CAG GTG ACC CTG	4777
Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile Gln Val Thr Leu	
1440	1445
1450	
TTG GAC ACA GTG GAG CTG GCC ACA TAC ACT GTG CGC ACC TTC GCA CTC	4825
Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Arg Thr Phe Ala Leu	
1455	1460
1465	

CAC AAG AGT GGC TCC AGT GAG AAG CGT GAG CTG CGT CAG TTT CAG TTC	4873
His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg Gln Phe Gln Phe	
1470 1475 1480 1485	
ATG GCC TGG CCA GAC CAT GGA GTT CCT GAG TAC CCA ACT CCC ATC CTG	4921
Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro Thr Pro Ile Leu	
1490 1495 1500	
GCC TTC CTA CGA CGG GTC AAG GCC TGC AAC CCC CTA GAC GCA GGG CCC	4969
Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu Asp Ala Gly Pro	
1505 1510 1515	
ATG GTG GTG CAC TGC AGC GCG GGC GTG GGC CGC ACC GGC TGC TTC ATC	5017
Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Cys Phe Ile	
1520 1525 1530	
GTG ATT GAT GCC ATG TTG GAG CGG ATG AAG CAC GAG AAG ACG GTG GAC	5065
Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu Lys Thr Val Asp	
1535 1540 1545	
ATC TAT GGC CAC GTG ACC TGC ATG CGA TCA CAG AGG AAC TAC ATG GTG	5113
Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Met Val	
1550 1555 1560 1565	
CAG ACG GAG GAC CAG TAC GTG TTC ATC CAT GAG GCG CTG CTG GAG GCT	5161
Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala Leu Leu Glu Ala	
1570 1575 1580	
GCC ACG TGC GGC CAC ACA GAG GTG CCT GCC CGC AAC CTG TAT GCC CAC	5209
Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn Leu Tyr Ala His	
1585 1590 1595	

ATC CAG AAG CTG GGC CAA GTG CCT CCA GGG GAG AGT GTG ACC GCC ATG	5257
Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser Val Thr Ala Met	
1600 1605 1610	
GAG CTC GAG TTC AAG TTG CTG GCC AGC TCC AAG GCC CAC ACG TCC CGC	5305
Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala His Thr Ser Arg	
1615 1620 1625	
TTC ATC AGC GCC AAC CTG CCC TGC AAC AAG TTC AAG AAC CGG CTG GTG	5353
Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys Asn Arg Leu Val	
1630 1635 1640 1645	
AAC ATC ATG CCC TAC GAA TTG ACC CGT GTG TGT CTG CAG CCC ATC CGT	5401
Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu Gln Pro Ile Arg	
1650 1655 1660	
GGT GTG GAG GGC TCT GAC TAC ATC AAT GCC AGC TTC CTG GAT GGT TAT	5449
Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Leu Asp Gly Tyr	
1665 1670 1675	
AGA CAG CAG AAG GCC TAC ATA GCT ACA CAG GGG CCT CTG GCA GAG AGC	5497
Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ala Glu Ser	
1680 1685 1690	
ACC GAG GAC TTC TGG CGC ATG CTA TGG GAG CAC AAT TCC ACC ATC ATC	5545
Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn Ser Thr Ile Ile	
1695 1700 1705	
GTC ATG CTG ACC AAG CTT CGG GAG ATG GGC AGG GAG AAA TGC CAC CAG	5593
Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu Lys Cys His Gln	
1710 1715 1720 1725	

TAC TGG CCA GCA GAG CGC TCT GCT CGC TAC CAG TAC TTT GTT GTT GAC 5641
 Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr Phe Val Val Asp
 1730 1735 1740
 CCG ATG GCT GAG TAC AAC ATG CCC CAG TAT ATC CTG CGT GAG TTC AAG 5689
 Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu Arg Glu Phe Lys
 1745 1750 1755
 GTC ACG GAT GCC CGG GAT GGG CAG TCA AGG ACA ATC CGG CAG TTC CAG 5737
 Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile Arg Gln Phe Gln
 1760 1765 1770
 TTC ACA GAC TGG CCA GAG CAG GGC GTG CCC AAG ACA GGC GAG GGA TTC 5785
 Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr Gly Glu Gly Phe
 1775 1780 1785
 ATT GAC TTC ATC GGG CAG GTG CAT AAG ACC AAG GAG CAG TTT GGA CAG 5833
 Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu Gln Phe Gly Gln
 1790 1795 1800 1805
 GAT GGG CCT ATC ACG GTG CAC TGC AGT GCT GGC GTG GGC CGC ACC GGG 5881
 Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly
 1810 1815 1820
 GTG TTC ATC ACT CTG AGC ATC GTC CTG GAG CGC ATG CGC TAT GAG GGC 5929
 Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met Arg Tyr Glu Gly
 1825 1830 1835
 GTG GTC GAC ATG TTT CAG ACC GTG AAG ACC CTG CGT ACA CAG CGT CCT 5977
 Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg Thr Gln Arg Pro
 1840 1845 1850

GCC ATG GTG CAG ACA GAG GAC CAG TAT CAG CTG TGC TAC CGT GCG GCC 6025
 Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys Tyr Arg Ala Ala
 1855 1860 1865
 CTG GAG TAC CTC GGC AGC TTT GAC CAC TAT GCA ACG TAACTACCGC 6071
 Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr 1881
 1870 1875 1880
 TCCCCTCTCC TCCGCCACCC CCGCCGTGGG GCTCCGGAGG GGACCCAGCT CCTCTGAGCC 6131
 ATACCGACCA TCGTCCAGCC CTCCTACGCA GATGCTGTCA CTGGCAGAGC ACAGCCCACG 6191
 GGGATCACAG CGTTTCAGGA ACGTTGCCAC ACCAATCAGA GAGCCTAGAA CATCCCTGGG 6251
 CAAGTGGATG GCCCAGCAGG CAGGCACTGT GGCCCTTCTG TCCACCAGAC CCACCTGGAG 6311
 CCCGCTTCAA GCTCTCTGTT GCGCTCCCGC ATTTCTCATG CTTCTTCTCA TGGGGTGGGG 6371
 TTGGGGCAAA GCCTCCTTTT TAATACATTA AGTGGGGTAG ACTGAGGGAT TTTAGCCTCT 6431
 TCCCTCTGAT TTTTCCTTTC GCGAATCCGT ATCTGCAGAA TGGGCCACTG TAGGGGTTGG 6491
 GGTTTATTTT GTTTTGTTTT TTTTTTTTTT TTGTATGACT TCTGCTGAAG GACAGAACAT 6551
 TGCCTTCCTC GTGCAGAGCT GGGGCTGCCA GCCTGAGCGG AGGCTCGGCC GTGGGCCGGG 6611
 AGGCAGTGCT GATCCGGCTG CTCCTCCAGC CCTTCAGACG AGATCCTGTT TCAGCTAAAT 6671
 GCAGGGAAAC TCAATGTTTT TTAAAGTTTT GTTTTCCCTT TAAAGCCTTT TTTTAGGCCA 6731
 CATTGACAGT GGTGGGCGGG GAGAAGATAG GGAACACTCA TCCCTGGTCG TCTATCCCAG 6791
 TGTGTGTTTA ACATTCACAG CCCAGAACCA CAGATGTGTC TGGGAGAGCC TGGCAAGGCA 6851
 TTCCTCATCA CCATCGTGTT TGCAAAGGTT AAAACAAAAA CAAAAAACCA CAAAAATAAA 6911
 AAACAAAAAA AACAAAAAAC CCAAAAAAAA AAAAAAAAAG AGTCAGCCCT TGGCTTCTGC 6971
 TTCAAACCCT CAAGAGGGGA AGCAACTCCG TGTGCCTGGG GTTCCCGAGG GAGCTGCTGG 7031
 CTGACCTGGG CCCACAGAGC CTGGCTTTGG TCCCCAGCAT TGCAGTATGG TGTGGTGTTC 7091
 GTAGGCTGTG GGGTCTGGCT GTGTGGCCAA GGTGAATAGC ACAGGTTAGG GTGTGTGCCA 7151
 CACCCCATGC ACCTCAGGGC CAAGCGGGGG CGTGGCTGGC CTTTCAGGTC CAGGCCAGTG 7211
 GGCCTGGTAG CACATGTCTG TCCTCAGAGC AGGGGCCAGA TGATTTTCCT CCCTGGTTTG 7271

CAGCTGTTTT CAAAGCCCCC GATAATCGCT CTTTTCCACT CCAAGATGCC CTCATAAACC 7331
AATGTGGCAA GACTACTGGA CTTCTATCAA TGGTACTCTA ATCAGTCCTT ATTATCCCAG 7391
CTTGCTGAGG GGCAGGGAGA GCGCCTCTTC CTCTGGGCAG CGCTATCTAG ATAGGTAAGT 7451
GGGGGCGGGG AAGGGTGCAT AGCTGTTTTA GCTGAGGGAC GTGGTGCCGA CGTCCCCAAA 7511
CCTAGCTAGG CTAAGTCAAG ATCAACATTC CAGGGTTGGT AATGTTGGAT GATGAAACAT 7571
TCATTTTTAC CTTGTGGATG CTAGTGCTGT AGAGTTCACT GTTGTACACA GTCTGTTTTC 7631
TATTTGTAA GAAAACTAC AGCATCATTG CATAATTCTT GATGGTAATA AATTTGAATA 7691
ATCAGATTTC T 7702

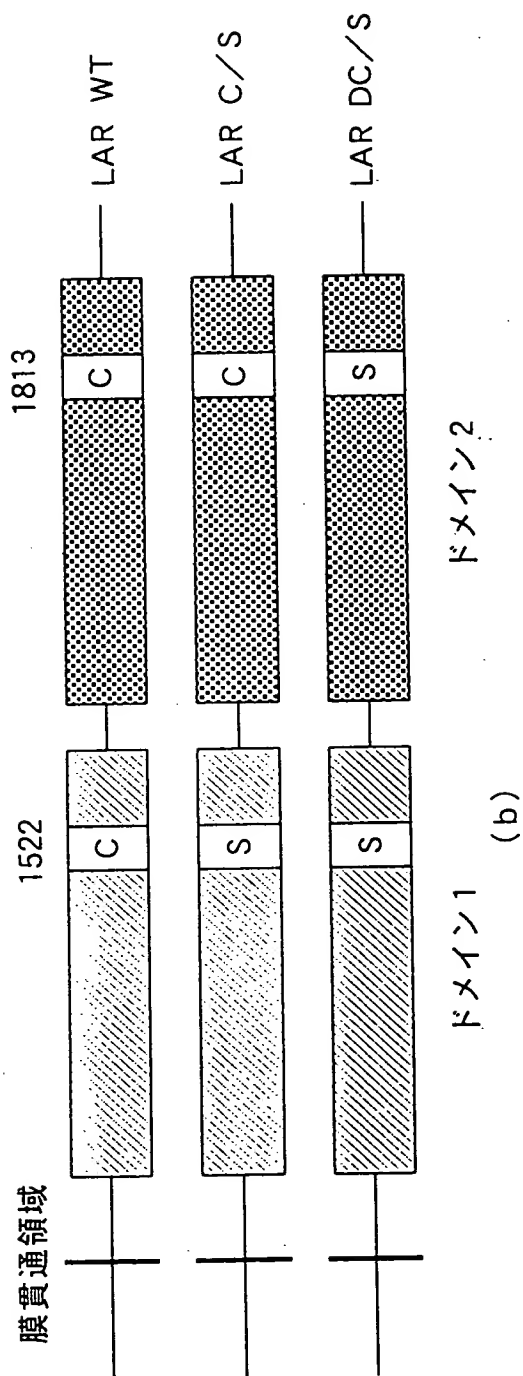
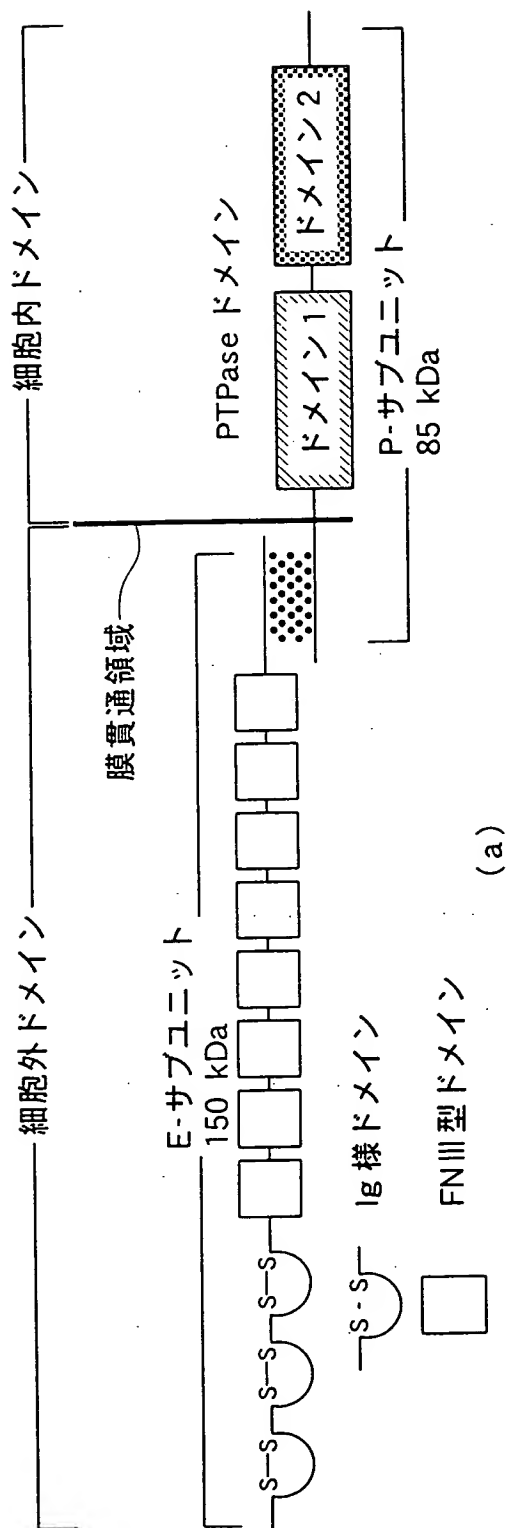
請求の範囲

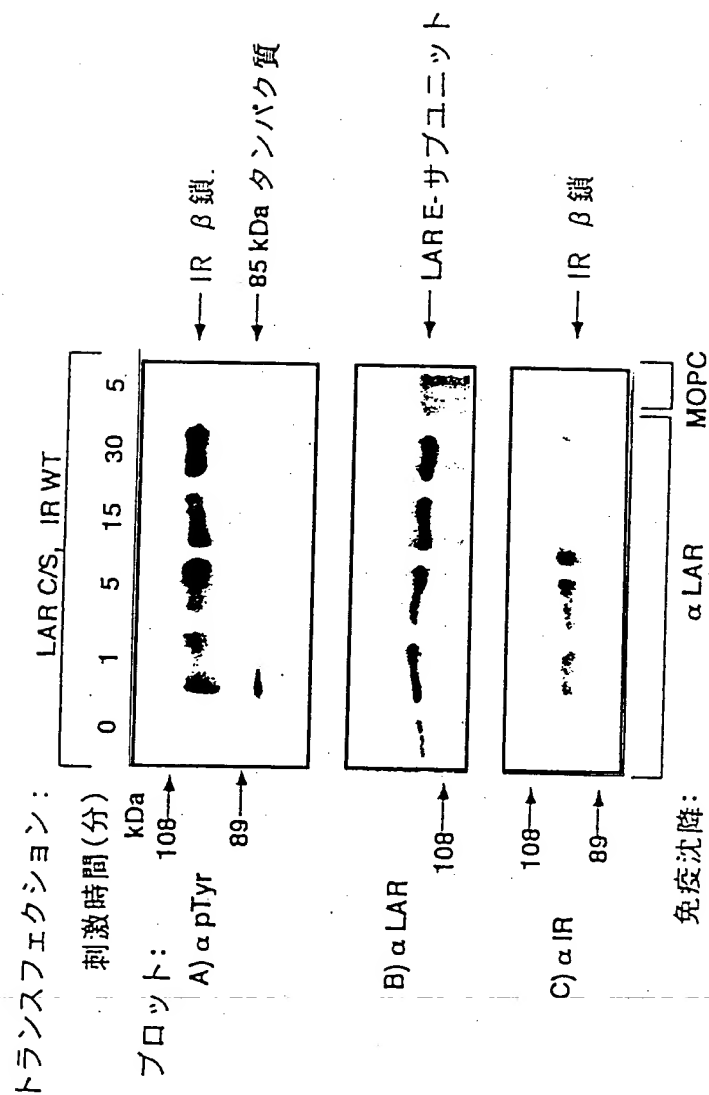
1. LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体。
2. LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体。
3. LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有し、且つCD45に対する特異性を有しない抗体。
4. 配列番号：1で示される塩基配列によってコードされるポリペプチドまたはその断片を抗原として調製される請求の範囲第1乃至3項のいずれかに記載の抗体。
5. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1乃至4項のいずれかに記載の抗体。
6. 受託番号がFREM BP-6343であるハイブリドーマにより産生される、LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有するモノクローナル抗体。
7. 約150 kDaの分子量を有する請求の範囲第5または6項記載の抗体。
8. 請求の範囲第5または7項記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系。
9. 受託番号がFREM BP-6343であるハイブリドーマ細胞系。
10. LARおよび／またはLAR由来分子の定量方法であつて、請求の範囲第1乃至7項のいずれかに記載の抗体を使用して、被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドの量を測定することを特徴とする定量方法。
11. 前記抗体が、イムノブロッティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用される請求の範囲第10項記載の定量方法。

- 1 2. LARおよび／またはLAR由来分子の活性を定量するための方法であ
って、請求の範囲第 1 乃至 7 項のいずれかに記載の抗体を用いて被検試
料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞
内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを単離し、単離されたLARの
- 5 活性を測定する工程を含む方法。
- 1 3. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィ
ニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求
の範囲第 1 2 項記載の方法。
- 1 4. LARおよび／またはLAR由来分子を生産するための方法であって、
- 1 0 請求の範囲第 1 乃至 7 項のいずれかに記載の抗体を用いてLARのタンパク
質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくは
ポリペプチドを単離する工程を含む方法。
- 1 5. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィ
ニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求
1 5 の範囲第 1 4 項記載の方法。
- 1 6. LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認する
ための方法であって、請求の範囲第 1 乃至 7 項のいずれかに記載の抗体
を用いて免疫組織学的検査を行い、LARのタンパク質、および／または少
なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを検出す
2 0 る工程を含む方法。

- LARのホスファターゼサブユニット、特にホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに特異性を有する抗体、およびかかる抗体を生産する
- 5 細胞ならびに、この抗体を使用したLAR/LAR由来分子の定量、検査方法を開示する。この抗体は、LARのタンパク質および活性の定量や、LARの生産、インスリンのシグナル伝達機構の解明ならびにLAR関連分子の同定および取得のための極めて有用なツールになり得、NIDDMやインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防および診断ならびに
- 10 動脈硬化および心疾患発症の予防および診断に応用できる。

第1図





トランスフェクション:

プロット:

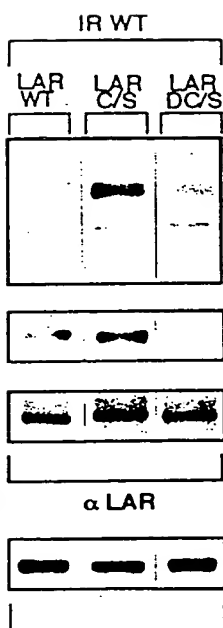
A) α pTyr

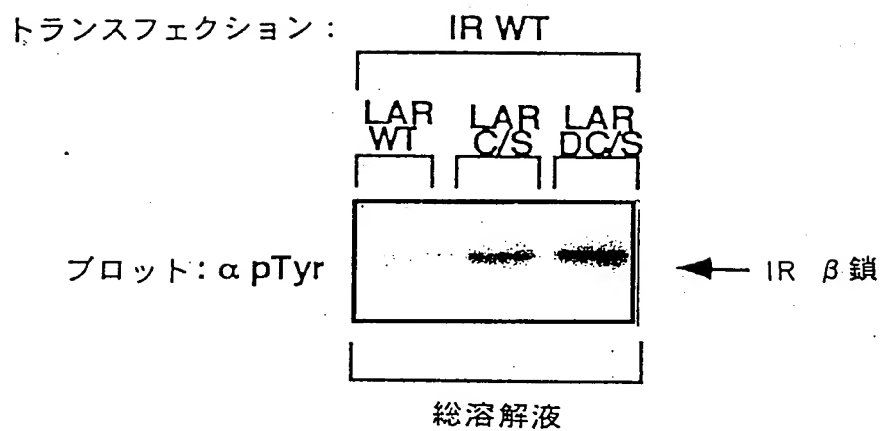
B) α IR

C) α LAR

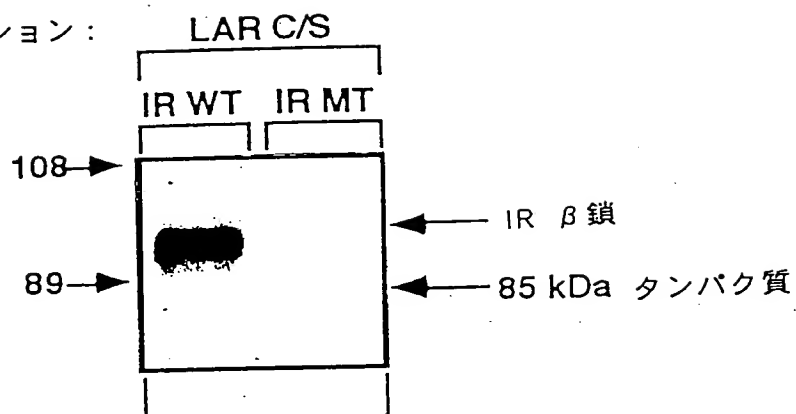
免疫沈降:

D) α IR

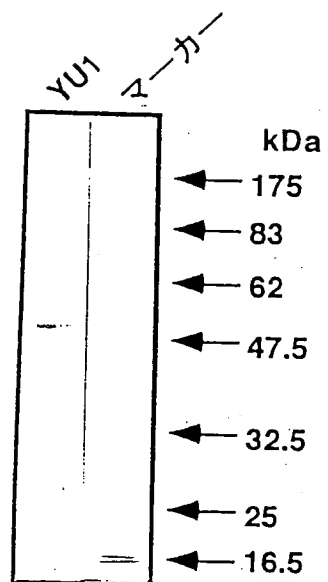


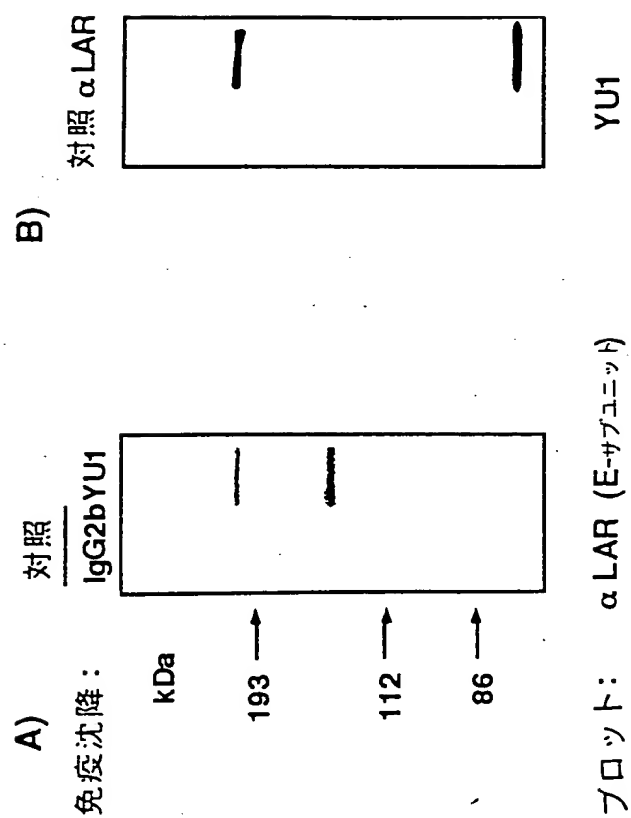


トランスフェクション:

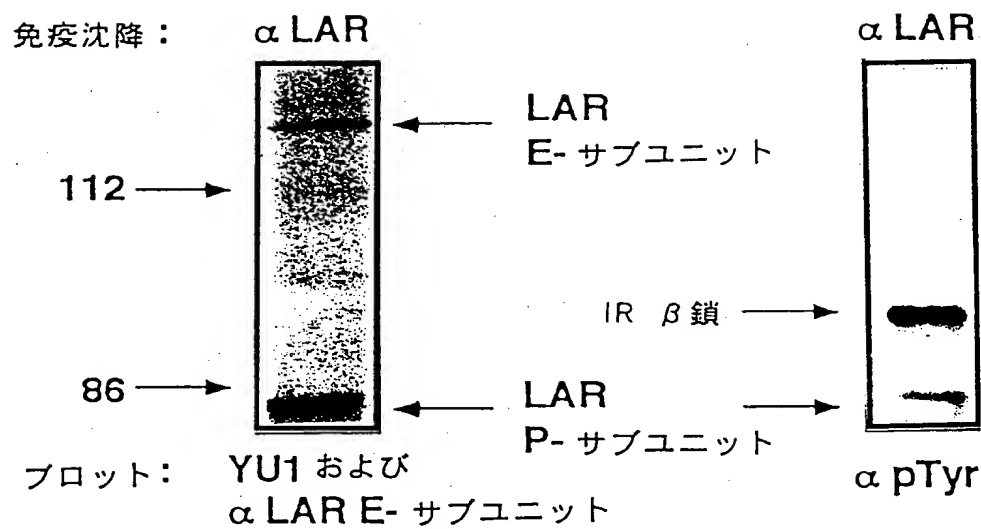


免疫沈降: α LAR
 プロット: α pTyr

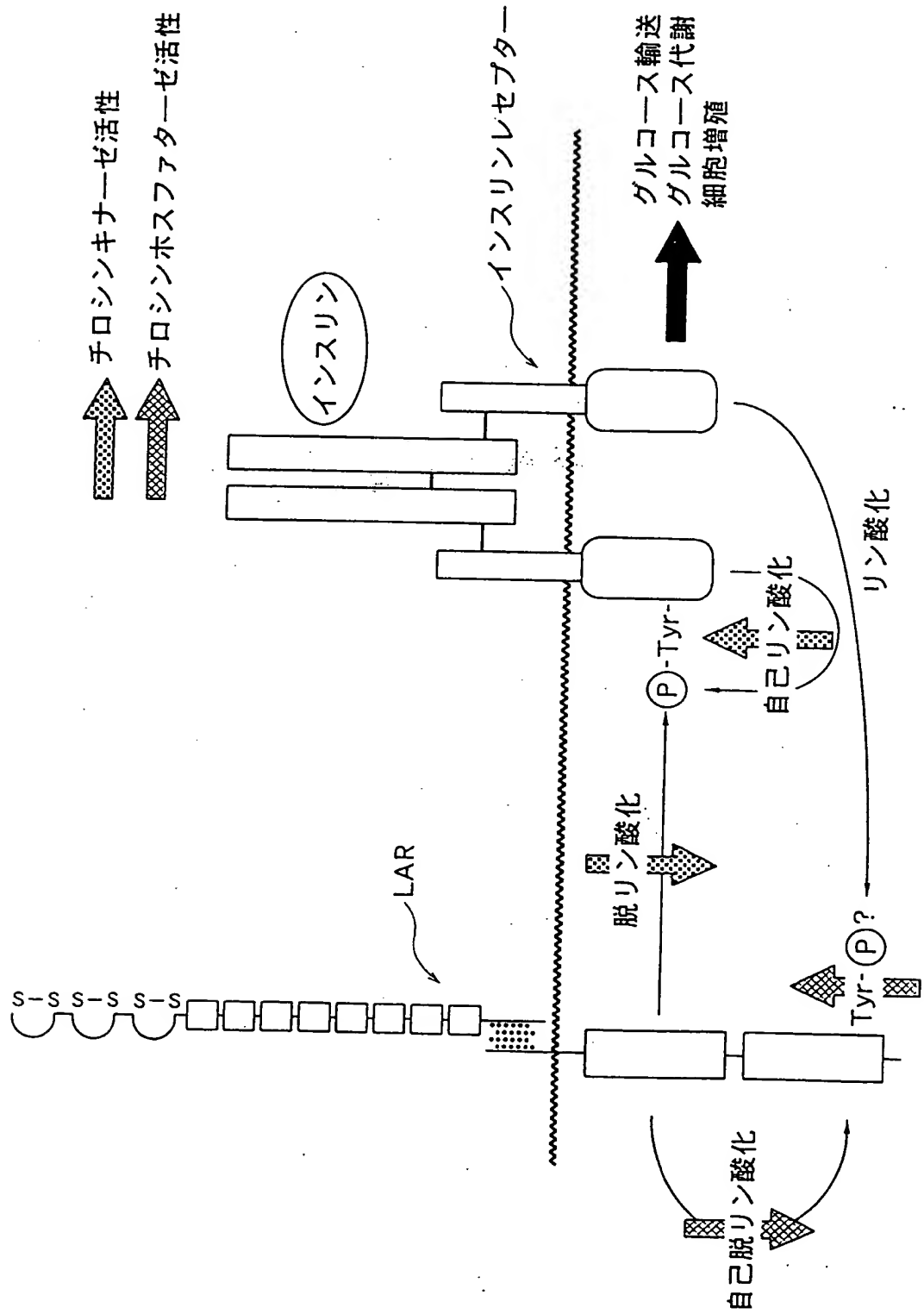




第8図



第9図



THIS PAGE BLANK (USPTO)
